

ELASTIZITÄTSMESSUNGEN AN LEBENDEN ZELLEN
MIT DEM RASTERKRAFTMIKROSKOP

Dissertation der Fakultät für Physik
der
Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Christian Rotsch
aus
Mühlhausen

München, den 21. Mai 1999

1. Gutachter : Priv. Doz. Dr. M. Radmacher

2. Gutachter : Prof. Dr. R. Kudritzki

Tag der mündlichen Prüfung : 7. 12. 1999

Danksagung

Nach mehr als drei Jahren, in denen ich Freuden und Leiden einer Promotion erlebt habe, möchte ich allen danken, die mir in dieser langen Zeit zur Seite gestanden haben:

Manfred Radmacher für die Einarbeitung am AFM, für viele gute Ideen und hilfreiche Diskussionen, für jede Menge Freiraum, für die Korrektur des Manuskripts,... oder - kurz zusammengefaßt - für eine optimale Betreuung.

Hermann Gaub für die Möglichkeit, meine Promotion an seinem Lehrstuhl durchführen zu können, aber auch für die Gastfreundschaft z. B. beim alljährlichen Schlittenfahren auf der Firstalm.

Den Kooperationspartnern **Ken Jacobson** und **Filip Braet** für diverse Privatvorlesungen „Zellbiologie für Physiker“. Gut, daß ich jemanden fragen konnte, der sich mit so etwas auskennt.

Unserer kleinen Gruppe, dem „Team Manfred“, für viele wertvolle Anregungen. Insbesondere **Jan Domke** für geteilten (also halben?) Frust über nicht scannende Scanner, fürs Simulieren, fürs Mitbringen wichtiger Vortragsfolien, ...

Angelika Kardinal für hunderte Petrischalen mit glücklichen Zellen.

Matthias Rief, der mir als mobiles Igor-Handbuch oft und gern helfen konnte.

Dem Rest der Gruppe für zahlreiche, nicht nur physikalisch wertvolle Diskussionen, aber vor allem für ein unglaublich gutes Arbeitsklima.

Hildegard für ihren unverzichtbaren Beitrag zur allnachmittäglichen Kaffeepause.

Meinen Eltern für ihre Hilfe und Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Andrea für viel Geduld in den letzten Wochen, fürs Korrekturlesen, aber vor allem für jede Menge Ablenkung.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	7
2. EINLEITUNG	9
2.1 EIGENSCHAFTEN UND ANWENDUNGSBEREICHE DES RASTERKRAFTMIKROSKOPS	9
2.2 ZELLBIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	10
2.3 MOTIVATION	12
3. MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 DAS RASTERKRAFTMIKROSKOP	16
3.1.1 AUFBAU UND FUNKTIONSWEISE	16
3.1.2 ABBILDUNGSMODI	17
3.1.3 KRAFTKURVEN	18
3.1.4 FORCE MAPS	19
3.2 VERSUCHSAUFBAU	21
3.2.1 ZELLEXPERIMENTE	21
3.2.2 ELEKTROSTATIK	24
3.3 BERECHNUNG DER ELASTIZITÄTSMODULI	24
3.3.1 DEFINITION	24
3.3.2 HERTZ-MODELL	25
3.3.3 THEORETISCHER VERLAUF EINER KRAFTKURVE	26
3.3.4 ALGORITHMUS ZUR AUSWERTUNG DER KRAFTKURVEN	28
3.3.5 FEHLERANALYSE	30
3.3.6 WAHL DES FITBEREICHES	32
4. ELEKTROSTATIK	37
4.1 KOLLOIDALE KRÄFTE	37
4.2 EINFLUß DER ELEKTROSTATIK AUF AFM-BILDER	40
4.3 LATERALE AUFLÖSUNG	43
4.4 ABHÄNGIGKEIT VOM ELEKTROLYTEN	46
4.5 DEBYE-HÜCKEL-THEORIE	49
4.6 FLUKTUATIONEN	50
5. ELASTIZITÄT VON ZELLEN	52
5.1 EINFLUß DER PROBENELASTIZITÄT AUF AFM-BILDER	52
5.2 IDENTIFIKATION ZELLULÄRER STRUKTUREN	58
5.3 SPANNUNGSFASERN UND ZELLELASTIZITÄT	59
5.4 AUFLÖSUNGSVERMÖGEN DES AFM AUF LEBENDEN ZELLEN	62
6. MANIPULATIONEN AM ZYTOSKELETT	70
6.1 EIGENSCHAFTEN DER WIRKSTOFFE	71
6.2 KONVEKTION VERZÖGERT DEN EFFEKT DER WIRKSTOFFE	73
6.3 DAS AKTINNETZWERK VERLEIHT TIERZELLEN MECHANISCHE STABILITÄT	77
6.4 VERSCHIEDENE WIRKMECHANISMEN DER DROGEN WURDEN BEOBACHTET	80
6.4.1 CYTOCHALASIN D BEWIRKT EINE AGGREGATION VON AKTIN	80
6.4.2 DIE EFFEKTE VON CYTOCHALASIN B UND LATRUNCULIN A SIND ÄHNLICH	83
6.4.3 JASPLAKINOLIDE GREIFT SPANNUNGSFASERN NICHT AN	87

6.4.4	PHALLOIDIN GELANGT NICHT DURCH DIE ZELLMEMBRAN	89
6.5	KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT UND ZEITLICHER VERLAUF	90
6.6	MIKROTUBULI BEEINFLUSSEN DIE ZELLSTABILITÄT KAUM	91
6.7	LANGZEITEXPERIMENTE SIND MÖGLICH	92
6.8	ZUSAMMENFASSUNG	93
7.	KRIECHENDE ZELLEN	95
7.1	FIBROBLASTEN	97
7.1.1	DURCHFÜHRUNG DER MESUNGEN	97
7.1.2	KINETIK DER BEWEGUNG DES ZELLRANDS	98
7.1.3	HÖHENFLUKTUATIONEN	102
7.1.4	MITTLERE HÖHEN- UND ELASTIZITÄTSPROFILE	103
7.2	KERATOCYTEN	107
7.3	MTLN3-ZELLEN	109
8.	CUTICULA	116
8.1	UNTERSUCHUNG DER STRUKTUR	117
8.2	ELASTIZITÄTSMESSUNGEN	118
8.3	DAS QUELLVERHALTEN	121
9.	AUSBLICK	124
ANHANG		126
A.1	ZELLKULTUR	126
A.1.1	HÜHNERHERZZELLEN	126
A.1.2	3T3- UND NRK-FIBROBLASTEN	127
A.1.3	KUPFFERZELLEN UND LEBERENDOTHELZELLEN	128
A.1.4	KERATOCYTEN	128
A.1.5	MTLN3-ZELLEN	129
A.1.6	CUTICULA	129
A.2	ZUGABE VON WIRKSTOFFEN	130
A.3	FLUORESCENZ	130
A.4	PRÄPARATION DER LIPIDPATCHES	131
A.5	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	131
LITERATURVERZEICHNIS		133
EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN		145

1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) Untersuchungen an lebenden Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Versuchsanordnung aufgebaut, die ein kommerziell erhältliches AFM mit einem invertierten optischen Mikroskop kombiniert. Die Anordnung erlaubt es, während der Messung Umgebungsbedingungen aufrechtzuerhalten, bei denen Zellen über lange Zeiträume hinweg überleben.

Zunächst wurde eine festkörpergestützte Lipidschicht als Modellsystem verwendet, um die komplexe Wechselwirkung zwischen AFM-Spitze und Zellmembran zu charakterisieren. Daraus ergab sich eine Methode zur orts aufgelösten Messung elektrostatischer Oberflächeneigenschaften.

Die ersten Experimente an lebenden Zellen dienten der Beantwortung einiger grundlegender Fragen zur Bildentstehung an weichen Proben. Dazu zählen die Diskussion des verringerten Auflösungsvermögens und die Interpretation des Abbildungsvorgangs. Durch Korrelation der AFM-Messungen mit strukturellen Daten in Form von Fluoreszenzbildern konnten faserige Strukturen, die häufig in AFM-Bildern lebender Zellen auftreten, als Spannungsfasern (Bündel von Aktinfilamenten) identifiziert werden.

Den Hauptteil der Arbeit bilden Elastizitätsmessungen an Zellen, die ebenfalls mit Hilfe des AFM durchgeführt wurden. Die lokalen Elastizitätsmoduli einer Probe werden dabei aus dem Verlauf von Kraftkurven berechnet. Dieser Berechnung liegt das Hertz-Modell für die elastische Eindrückung zweier Körper zugrunde. Einschränkungen, die sich ergeben, wenn Voraussetzungen des Modells hinsichtlich Probenbeschaffenheit und geometrischer Verhältnisse des Systems nicht erfüllt sind, wurden experimentell untersucht und theoretisch diskutiert.

Um eine Interpretation der Elastizitätsbilder zu ermöglichen, mußte geklärt werden, welche Bestandteile den Zellen mechanische Stabilität verleihen. Morphologischen Überlegungen zufolge spielt das Zytoskelett die Rolle einer Stützstruktur, die die Zellen nicht nur stabilisiert, sondern auch verschiedene Bewegungsvorgänge ermöglicht. Durch gezielte Manipulationen konnte gezeigt werden, daß das Aktinnetzwerk, eine Komponente des Zytoskeletts, von entscheidender Bedeutung für die Zellelastizität ist. In analogen Experimenten wurde festgestellt, daß Mikrotubuli, die ebenfalls zum Zytoskelett gehören, keinen Einfluß auf die Stabilität von Zellen haben. Die

Manipulationen wurden mit Hilfe verschiedener chemischer Wirkstoffe durchgeführt, die spezifisch bestimmte Bestandteile des Zytoskeletts angreifen. Dabei konnten sogar Unterschiede in den Mechanismen der Wirkstoffeffekte beobachtet werden.

Eine erste Anwendung fanden diese Resultate bei der Untersuchung kriechender Zellen. Dieser Bewegungsvorgang beruht auf koordinierten Umstrukturierungen im Aktinnetzwerk und spielt eine entscheidende Rolle z. B. bei der Ausbreitung von Krebs, bei der Embryonalentwicklung oder bei Reaktionen des Immunsystems. Mit Hilfe von Elastizitätsmessungen an aktiven Lamellipodien kriechender Bindegewebszellen wurden Erkenntnisse über den molekularen Mechanismus gewonnen, der der Bewegung dieser Zellen zugrunde liegt. Von vier Modellvorstellungen über den Ursprung der Kraft, die das Lamellipodium vorwärts schiebt, sind nur zwei mit den AFM-Daten konsistent.

Die Fortsetzung dieser Messungen bilden ähnliche Experimente mit schnell kriechenden Keratocyten sowie mit chemotaktisch stimulierten MTLn3-Zellen.

In einem weiteren Projekt wurde das Quellverhalten der Cuticula untersucht. Die Cuticula ist die wachsartige extrazelluläre Schicht an der Oberfläche von Blättern hochentwickelter Pflanzen. Sie reguliert den Wasserhaushalt der Pflanzen. Aus dem gemessenen Quellverhalten ergaben sich Rückschlüsse auf die Diffusionsrate von Wasser durch die Cuticula.

2. Einleitung

2.1 Eigenschaften und Anwendungsbereiche des Rasterkraftmikroskops

Nachdem Binnig und Rohrer 1982 das Rastertunnelmikroskop entwickelt hatten [1], entstand in den folgenden Jahren eine ganze Gruppe ähnlicher Techniken - die sogenannten Rastersondenmikroskopien [2]. Ihnen ist gemeinsam, daß mit Hilfe einer piezogesteuerten Sonde die jeweilige Probe im Nahfeld abgerastert wird. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das 1986 von Binnig, Quate und Gerber entwickelte Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope - AFM) [3]. Im AFM wird die direkte mechanische Wechselwirkung zwischen Sonde (AFM-Spitze) und Probe detektiert. Auf harten, anorganischen Proben kann dabei atomare Auflösung erreicht werden [4,5]. Vor allem die Möglichkeit, das AFM in Flüssigkeiten zu betreiben, macht diese Technik aber auch für biologische Anwendungen interessant [6]. So können z. B. einzelne Proteine, aber auch ganze lebende Zellen in physiologischer Umgebung untersucht werden [7-9].

Neben bildgebenden Betriebsmodi bietet das AFM auch die Möglichkeit, sogenannte Kraftkurven aufzunehmen. Dabei werden gezielt Kräfte im Piconewtonbereich ausgeübt, indem die AFM-Spitze vertikal bewegt wird. Das kann z. B. ausgenutzt werden, um Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen zu betreiben [10]. Auf weichen Proben wird die AFM-Spitze bei der vertikalen Bewegung in die Probe eingedrückt. Aus dem Verlauf der Kraftkurve kann man den lokalen Elastizitätsmodul an der untersuchten Stelle berechnen [11]. In Verbindung mit dem Force-Mapping-Modus [12], der es ermöglicht, zweidimensionale Felder von Kraftkurven aufzunehmen, erhält man dann Elastizitätsbilder. Damit bietet das AFM - eigentlich eine oberflächenempfindliche Technik - eine tiefensensitive Meßmethode, die es erlaubt, „in die Probe hineinzuschauen“.

In der Zellbiologie ergeben sich durch die Anwendung des AFM eine Fülle neuer Möglichkeiten. Im Gegensatz zum Lichtmikroskop können mit dem AFM Zellhöhen gemessen werden. Verglichen mit optischen Untersuchungen erreicht man zusätzlich eine deutlich höhere laterale Auflösung, die allerdings aufgrund der Weichheit der Probe nicht im atomaren Bereich liegt, sondern etwa 50nm beträgt [13]. Die Zugabe zytotoxischer Substanzen, die z. B. bei der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung bestimmter Zellbestandteile benötigt werden, ist nicht erforderlich. Im Unterschied

zur Elektronenmikroskopie ist ein Arbeiten in physiologischem Puffer, d. h. an der lebenden Zelle möglich. Mit dem lokalen Elastizitätsmodul erschließt sich eine Meßgröße, die für Zellen bisher nur makroskopisch, *in vitro* oder punktuell zugänglich war [14,15].

2.2 Zellbiologische Grundlagen

Für die biochemische Untersuchung lebender Zellen werden oft große Mengen eines konkreten Zelltyps benötigt. Um eine solche homogene Zellpopulation zu erhalten, wurden zahlreiche Verfahren zum Herauslösen von Zellen aus Geweben und zur Trennung der verschiedenen Typen entwickelt. Die dabei entstehenden Primärkulturen können direkt verwendet oder in eingeschränktem Maße in Zellkultur vermehrt werden. Wesentlich einfacher ist jedoch die Verwendung von Zelllinien, die im Labor beliebig oft vermehrt werden können [16,17]. Dabei handelt es sich um Krebszellen, die durch spontane Mutation oder auf gentechnischem Wege aus Wildtypzellen entstanden sind. Oft unterscheiden sich diese Zellen zwar erheblich von den Zellen des ursprünglichen Gewebes (z. B. bzgl. Teilungsrate und Adhäsionsverhalten), eignen sich aber dennoch in vielen Fällen zur Untersuchung grundlegender zellulärer Eigenschaften. Vorteile von Zelllinien gegenüber Primärkulturen sind neben der einfachen Handhabbarkeit die Möglichkeit, diese Zellen bei -70°C unbegrenzt aufzubewahren, sowie die nicht erforderliche Verwendung eines Spenderlebewesens.

Sowohl Primärkulturen als auch Zelllinien können in Kulturgefäßen gehalten und vermehrt werden. Die Ernährung der Zellen wird durch ein Zellmedium gewährleistet, das verschiedene Proteine, Zucker und anorganische Salze enthält. Diesem werden noch Antibiotika, Antimykotika und wachstumsfördernde Seren zugesetzt. Im Inkubator werden die Kulturgefäße bei 37°C aufbewahrt, und durch einen CO₂-Gehalt der Luft von 5% wird der pH-Wert des Mediums stabilisiert. Im Gegensatz zu Bakterien können sich die meisten Gewebezellen nicht in Suspension vermehren, sondern benötigen dazu eine feste Oberfläche. Im Gewebe ist das die extrazelluläre Matrix, die in Zellkultur durch den Boden der Petrischale ersetzt wird. Das Plastikmaterial der Petrischale ist chemisch so beschaffen, daß die meisten Zellen direkt darauf wachsen können. Ansonsten ist eine Beschichtung mit Substanzen aus der extrazellulären Matrix erforderlich.

An den Boden von Petrischalen adhärierte Zellen breiten sich dort sehr flach aus.

Typische Durchmesser liegen in der Größenordnung von 10-100µm, während die maximalen Höhen meist nur wenige µm betragen. Morphologisch können die Zellen grob in die nukleare und die umgebende perinukleare Region sowie in die wesentlich flacheren *Lamellipodien* unterteilt werden.

Eukaryontenzellen, also Tierzellen mit Ausnahme der Bakterien sind in der Lage, gerichtete Bewegungen auszuführen und verschiedene Formen anzunehmen. Diese Fähigkeiten beruhen auf dem *Zytoskelett*, einem Netzwerk aus Proteinfilamenten, das sich durch das gesamte Zytoplasma erstreckt [18]. Das Zytoskelett ist eine dynamische Struktur, die sich ständig neu organisiert [19]. Diese dynamische Umstrukturierung ermöglicht es den Zellen, sich zu teilen, zu kriechen oder andere Bewegungsvorgänge durchzuführen.

Der Begriff Zytoskelett umfaßt drei einzelne komplexe Netzwerke verschiedener Proteinfilamente. Jeder dieser Filamenttypen stellt die polymerisierte Form des zugehörigen Proteinmonomers dar.

Aktinfilamente sind aus Aktinmonomeren zusammengesetzt und haben einen Durchmesser von 8nm. Verschiedene aktinbindende Proteine (ABP) können Aktinfilamente bündeln, quervernetzen und an andere Zellbestandteile binden [20]. Motorproteine wie Myosin II können parallele Aktinfilamente relativ zueinander verschieben und tragen auf diese Weise z. B. zur Muskelkontraktion bei. Gebündelte Aktinfilamente bilden *Spannungsfasern* (engl. *stress fibres*), die in sogenannten *Fokalkontakten* (engl. *focal adhesions*) in die Zellmembran eingebettet sind und über feste Verbindungen mit der extrazellulären Matrix Zug auf diese ausüben und so z. B. zu Morphogenese oder Wundheilung beitragen.

Mikrotubuli sind röhrenförmige Filamente von etwa 25nm Durchmesser, die aus Tubulin gebildet werden. Von einem Organisationszentrum, dem *Zentrosom* ausgehend erstrecken sie sich durch das Zytoplasma und verleihen der Zelle ihre Polarität, indem sie die Positionen von Organellen und anderen Zellbestandteilen steuern. Einzelne Proteine, Vesikel und membranumhüllte Organellen können mit Hilfe von Motorproteinen gerichtet entlang der Mikrotubuli durch das Zytoplasma transportiert werden. Bei der Zellteilung bilden Mikrotubuli die mitotische Spindel, die unter anderem die Chromosomen trennt.

Intermediärfilamente sind widerstandsfähige, langlebige Proteinfasern mit Durchmessern von 8-10nm, die häufig ein in der Nähe des Zellkerns besonders dichtes

Netzwerk bilden. Dicht unterhalb der Kernhülle bilden sie die Kernlamina. Es gibt zahlreiche gewebespezifische Formen der Intermediärfilamente. Über ihre Funktion ist noch relativ wenig bekannt.

Sowohl bei Aktin als auch bei Tubulin besteht ein chemisches Gleichgewicht zwischen freien und im Filament gebundenen Monomeren. Die jeweiligen Filamente sind polare Gebilde mit je einem inaktiven, langsam wachsenden *Minus-Ende* und einem schnell wachsenden *Plus-Ende*. Der ständige Umbau des Aktinnetzwerks erfolgt durch den sogenannten *Tretmühl-Mechanismus*. Dabei werden am Plus-Ende ständig Monomere angefügt, während sich im zeitlichen Mittel am Minus-Ende Monomere ablösen, ohne daß sich die Gesamtlänge des Filaments ändert. Die Minus-Enden von Mikrotubuli sind dagegen oft im Zentrosom verankert. Hier spielt die *dynamische Instabilität* eine wichtige Rolle bei der Neuorganisation des Netzwerks. Sie bewirkt einen Übergang von langsamer Polymerisation zu rapidem Zerfall am Plus-Ende des Filaments.

2.3 Motivation

Das Potential des AFM für Untersuchungen an Zellen wurde bereits früh erkannt. In einem wegweisenden Experiment beobachteten Henderson *et al.* 1992 das dynamische Verhalten des Zytoskeletts lebender Glia-Zellen [21]. In den folgenden Jahren wurde das AFM u. a. eingesetzt, um dynamische Prozesse wie die Aktivierung von Blutplättchen [22,23], Exozytose [24] oder Zellteilung [25] im zeitlichen Ablauf zu untersuchen.

Aus den mechanischen Eigenschaften von Zellen können Informationen über zelluläre Prozesse abgeleitet werden [26,27]. Zellelastizitäten wurden daher schon vor der Entwicklung des AFM mit verschiedenen Techniken wie Cell Poking [28,29], akustischer Rastermikroskopie [30,31], Pipettenaspiration [32,33], Flickerspektroskopie [34] und optischen Pinzetten [35,36] gemessen. Der Vorteil des AFM gegenüber diesen Techniken liegt in der hohen lateralen Auflösung. Qualitative Messungen mechanischer Zelleigenschaften mit dem AFM wurden schon 1994 von Hoh und Schoenenberger durchgeführt [37]. Radmacher *et al.* untersuchten 1996 die Elastizität von Blutplättchen quantitativ und orts aufgelöst [9]. In weiterführenden Experi-

menten sollten nun im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Elastizitätsmessungen biologisch relevante Fragestellungen beantwortet werden.

In einem einleitenden Experiment wurde zunächst die Wechselwirkung zwischen AFM-Spitze und Zellmembran anhand eines vereinfachten Modellsystems, einer auf Glimmer absorbierten Lipidschicht in verschiedenen Elektrolytlösungen untersucht und charakterisiert. Allgemein ist die Wechselwirkung der Zellmembran mit extrazellulären Substraten, insbesondere die Adhäsion der Zelle, entscheidend für biologische Funktionen bzw. Fehlfunktionen wie Zytokinese oder Metastasis.

Die Elastizitätsbilder lebender Zellen können nur dann richtig interpretiert werden, wenn bekannt ist, welche zellulären Bestandteile in diesen Bildern sichtbar sind. Beim Abbilden fest adhärierter lebender Zellen mit dem AFM beobachtet man oft lange, faserige Strukturen [21], die bei schnell kriechenden Zellen nicht auftreten. Bisher wurde davon ausgegangen, daß es sich dabei um Spannungsfasern handelt, aber das konnte noch nicht zweifelsfrei bewiesen werden. Um die Strukturen als Spannungsfasern zu identifizieren, wurde das Aktin der Zellen spezifisch mit Farbstoffen markiert und die Fluoreszenzbilder mit AFM-Daten korreliert.

Aus der Zellbiologie ist bereits bekannt, daß Bewegungsvorgänge lebender Zellen wie z. B. Zellteilung, Phagozytose oder Muskelkontraktionen von umfangreichen Umstrukturierungen des Zytoskeletts begleitet werden. Das legt die Vermutung nahe, daß das Zytoskelett die mechanischen Eigenschaften der Zellen bestimmt und damit entscheidenden Einfluß auf die Elastizität der Zellen hat. Um dies zu überprüfen, wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, in denen die einzelnen Komponenten des Zytoskeletts gezielt zerstört oder stabilisiert wurden.

Solche Modifikationen des Zytoskeletts können durch chemische Wirkstoffe hervorgerufen werden, die in das Gleichgewicht zwischen gebundenen und freien Monomeren des jeweiligen filamentbildenden Proteins eingreifen. Diese Substanzen sind wichtige Hilfsmittel bei der Untersuchung des dynamischen Verhaltens des Zytoskeletts und seiner Komponenten. Ein Beispiel sind die Cytochalasine, eine Familie von Giften, die aus verschiedenen Pilzen gewonnen werden. Cytochalasine binden am Plus-Ende von Aktinfilamenten (Capping) und verhindern so die Anlagerung weiterer Monomere [38-40]. Weil am Minus-Ende des Filaments netto Monomere in Lösung gehen, führt Capping des Plus-Endes zur Depolymerisation des Filaments.

Elastizitätsmessungen während der Behandlung lebender Zellen mit Cytochalasinen und funktionell ähnlichen Wirkstoffen können Aufschluß darüber geben, ob und in welchem Ausmaß Aktinnetzwerk und Mikrotubuli die elastischen Eigenschaften der Zellen beeinflussen.

Neben der Untersuchung des Einflusses des Zytoskeletts auf die mechanischen Eigenschaften von Zellen bilden Experimente an kriechenden Zellen einen wichtigen Teil der vorliegenden Arbeit. Das Kriechen von Zellen ist Grundlage für so verschiedene Vorgänge wie Wundheilung, Phagozytose oder die Entstehung neuronaler Netze. Auch bei der Entstehung von Organen und Gliedmaßen eines Menschen aus einer befruchteten Eizelle spielt dieser Prozeß eine wichtige Rolle. Metastasen müssen kriechen, um in gesundes Gewebe eindringen zu können. Neue Erkenntnisse über das Kriechen von Zellen könnten daher helfen, solche Vorgänge besser zu verstehen.

Das Kriechen lebender Zellen ist ein komplexer Vorgang, der auf der ständigen dynamischen Umstrukturierung des Aktinnetzwerks beruht [41]. Abbildung 2.1 zeigt ein Modell, das die Fortbewegung langsam kriechender Zellen wie z. B. Fibroblasten

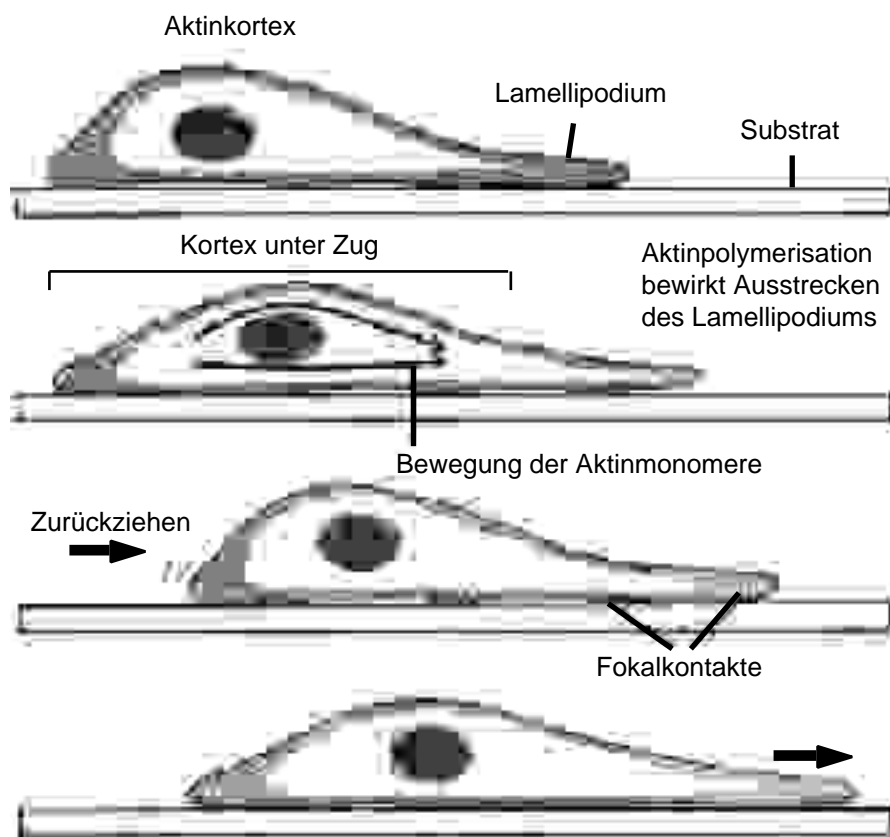


Abbildung 2.1: Modell für das Kriechen einer Zelle (aus [18])

(Bindegewebszellen) beschreibt. Durch Polymerisation von Aktin wird ein *Lamellipodium* ausgestreckt, an dessen Rand sich Fokalkontakte zwischen Zelle und Substrat bilden. In der Zellrinde (*Kortex*) entsteht dadurch eine Zugkraft, die den hinteren Teil der Zelle nachzieht.

Schneller kriechende Zellen wie Keratocyten (Fisch-Epidermiszellen) bilden keine Fokalkontakte, sondern sind über diffuse Kontaktstellen mit der Unterlage verbunden und bewegen sich daher auf andere Weise fort [42]. Es gibt also kein universelles Modell für das Kriechen von Zellen. Man geht allerdings davon aus, daß die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bei verschiedenen Zellen ähnlich sind. Die genauen Mechanismen, insbesondere der Ursprung der Kraft, die das Lamellipodium vorwärts schiebt, sind aber noch weitgehend ungeklärt [43].

In der vorliegenden Arbeit wurden Elastizitätsmessungen an kriechenden Fibroblasten durchgeführt, um die mechanischen Eigenschaften aktiver Lamellipodien zu untersuchen und hinsichtlich aktueller Modelle für das Kriechen von Zellen zu diskutieren. Eine Ergänzung dieser Ergebnisse bildeten Messungen an schnell kriechenden Keratocyten und an chemotaktisch stimulierten MTLn3-Zellen.

In weiteren Projekten wurden die Auswirkung einer Fixierung, also des unspezifischen Quervernetzens von Proteinen auf die Zellelastizität gemessen und das Quellverhalten der Schutzschicht an der Oberfläche von Blättern hochentwickelter Pflanzen (Cuticula) untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Das Rasterkraftmikroskop

3.1.1 Aufbau und Funktionsweise

Der prinzipielle Aufbau eines Rasterkraftmikroskops soll anhand der schematischen Darstellung in Abbildung 3.1 erläutert werden. Beim AFM besteht die Sonde aus einer biegsamen Blattfeder (*Cantilever*), an deren Unterseite eine pyramidenförmige Spitze (*AFM-Spitze*) befestigt ist. Die Probe wird auf einer Piezokeramik befestigt, die durch Anlegen geeigneter Spannungen in allen drei Raumrichtungen bewegt werden kann. Zum Abbilden wird die Probe dann zeilenweise horizontal gerastert. Währenddessen wird die Auslenkung des Cantilevers ständig mit Hilfe eines Laserzeigers detektiert, der von der goldbedampften Rückseite des Cantilevers auf eine 4-Segment-Photodiode reflektiert wird. Die Spitze folgt dabei dem Höhenprofil der Probe, so daß im angeschlossenen Steuercomputer ein topographisches Bild der untersuchten Region rekonstruiert werden kann.

Für die Messungen an lebenden Zellen wurde ein sogenanntes *Stand-Alone-AFM*

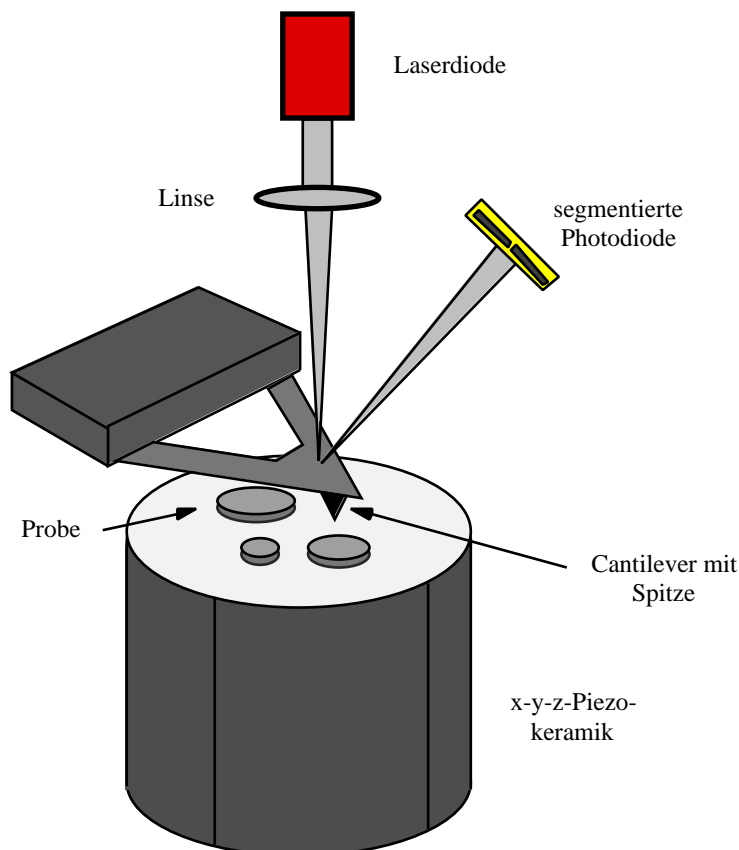


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops

verwendet, d. h. die AFM-Spitze wird über die nicht mitbewegte Probe gerastert. Vorteile dieses Aufbaus liegen darin, daß die Probe nun beliebig groß sein kann und von unten zugänglich bleibt. Man kann so z. B. das AFM in Kombination mit einem optischen Mikroskop betreiben, was im vorliegenden Fall die einfache und gezielte Positionierung der AFM-Spitze über einer bestimmten Zelle ermöglicht. Der gesamte Versuchsaufbau, der auch das Prinzip des Stand-Alone-AFM verdeutlicht, ist im Kapitel 3.2 in Abbildung 3.6 dargestellt.

3.1.2 Abbildungsmodi

Der einfachste Abbildungsmodus des AFM ist der *Constant Height Mode*. Dabei wird ausschließlich in horizontaler Richtung gerastert. Die vertikale Position des Piezos bleibt unverändert, so daß das Höhenprofil der Probe direkt aus der Cantileverauslenkung abgelesen werden kann. Der Constant Height Mode eignet sich zur Hochauflösung auf atomar flachen Oberflächen [4], bringt jedoch den Nachteil mit sich, daß an hohen Stellen der Probe große Cantileverauslenkungen auftreten, d. h. große Kräfte ausgeübt werden. Für Zellen, die typischerweise einige μm hoch sind, ist dieser Modus ungeeignet, weil insbesondere die großen lateralen Kräfte zu einer Zerstörung der Probe führen würden.

Mit Hilfe einer Nachregel Elektronik kann die vertikale Position des Cantilevers deshalb ständig so korrigiert werden, daß die Auslenkung des Cantilevers und damit die Auflagekraft einen frei wählbaren konstanten Wert beibehält. Im Idealfall des *Constant Force Mode* geschieht dies unendlich schnell. Der Piezo folgt dann dem Probenprofil. Die Höheninformation kann aus der am Piezo anliegenden Spannung gewonnen werden.

Im Realfall reagiert die Nachregelung mit einer gewissen Verzögerung auf Abweichungen der Cantileverauslenkung vom Sollwert, so daß insbesondere auf feinen Strukturen die Auslenkung nicht vollständig korrigiert wird. Die AFM-Spitze folgt in diesem, *Error Signal Mode* genannten Betriebsmodus [44] der groben Topographie der Probe wobei die Auflagekraft nahezu konstant bleibt. Man erhält dann simultan zwei Bilder: das *Höhenbild*, das aus der Piezospannung rekonstruiert wird und topographische Information über die Probe enthält, und das *Auslenkungsbild*, den nicht korrigierten Anteil der Cantileverauslenkung, in dem feine Korruptionen der Probe kontrastreich dargestellt werden. Man kann sich diese Bilder als gerichtet hoch- bzw.

tiefpaßgefilterte Darstellungen der Probentopographie vorstellen.

Andere Abbildungsmodi wie z. B. *Tapping* [45] wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet.

3.1.3 Kraftkurven

Das AFM bietet nicht nur die Möglichkeit, eine Probe abzubilden, sondern eignet sich auch als Werkzeug zum Ausüben und Messen von Kräften im Piconewtonbereich. So konnten z. B. Konformationsübergänge in einzelnen Polymeren untersucht [10] und Bindungskräfte in Rezeptor-Ligand-Systemen gemessen werden [46]. In der vorliegenden Arbeit wurde die direkte Wechselwirkung zwischen AFM-Spitze und Probe untersucht, um lokale Elastizitätsmoduli lebender Zellen zu bestimmen und die elektrostatischen Eigenschaften geladener Oberflächen zu charakterisieren.

Die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe ist je nach experimenteller Situation durch ein Gleichgewicht verschiedener Kräfte gekennzeichnet [47-49]. Durch Überlappen der Elektronenhüllen von Substrat und Spitze kommt es aufgrund des Pauli-Prinzips zur Hardcore-Abstoßung. Bei Abständen im Nanometerbereich wirken van-der-Waals-Kräfte. Falls an Luft experimentiert wird, bildet sich auf hydrophilen Materialien zwischen Spitze und Probe ein Wassermeniskus, der Adhäsion verursacht. Hinzu kommen beispielsweise Hydratationskräfte in flüssigen Medien oder die hier untersuchten elektrostatischen und elastischen Wechselwirkungen.

Quantitative Untersuchungen dieser Kräfte werden mit Hilfe von *Kraftkurven* durchgeführt. Dabei wird die AFM-Spitze, beginnend im freien Zustand, senkrecht an die Probe angenähert (*Approach*) und danach wieder abgehoben (*Retract*). Die Kraft ist gemäß dem Hooke'schen Gesetz über die Federkonstante des Cantilevers k_c linear mit der gemessenen Cantileverauslenkung verknüpft:

$$F(z) = k_c \cdot d(z) \quad (1)$$

In einer Kraftkurve wird die Auflagekraft $F(z)$ gegen die vertikale Position z des Cantilevers aufgetragen.

Ein typischer Verlauf einer einfachen Kraftkurve auf hartem Untergrund ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Während der Annäherung ist die Spitze zunächst nicht in Kontakt mit der Probe und der Cantilever wird nicht ausgelenkt (*Off-Surface-Teil*). In

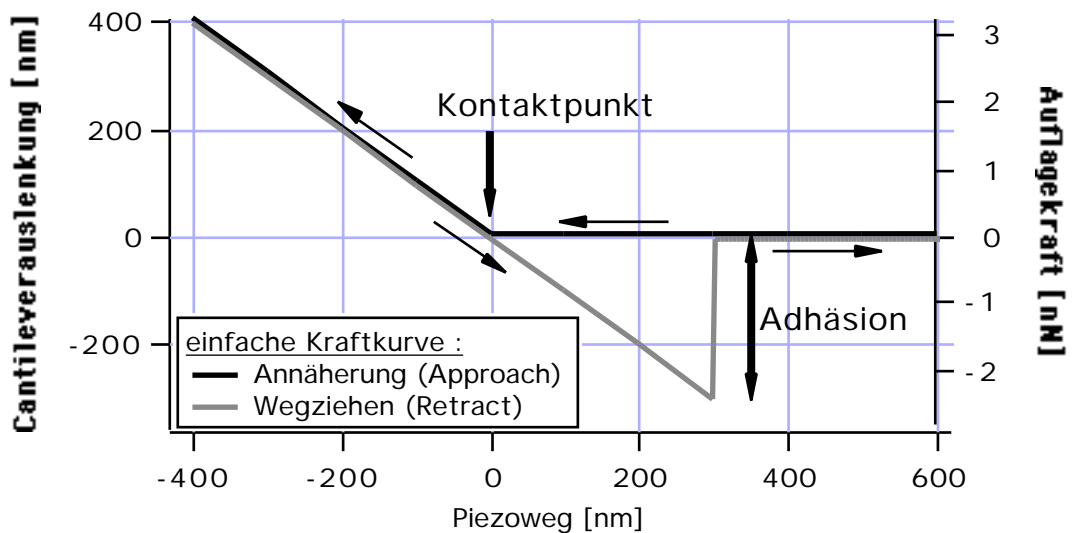


Abbildung 3.2: Verlauf einer einfachen Kraftkurve. Bei der Annäherung wird der Cantilever bis zum Kontaktpunkt nicht ausgelenkt, danach ist die Auslenkung gleich dem Piezoweg. Beim Wegziehen tritt Adhäsion auf (hier etwa 2,5nN)

unmittelbarer Nähe der Oberfläche - auf dieser Skala nicht zu erkennen - springt die Spitze dann aufgrund attraktiver Wechselwirkung (z. B. van der Waals) in Kontakt (*Kontaktpunkt*). Danach ist die Cantileverauslenkung gleich dem Piezoweg im einfachen Fall einer Kraftkurve auf hartem Substrat, d. h. wenn die AFM-Spitze nicht in die Probe eingedrückt wird. Wird der Cantilever wieder abgehoben, springt die Spitze erst von der Oberfläche weg, wenn die Federkraft die (z. B. durch Kapillarkräfte verursachte) Adhäsion zwischen Spitze und Probe übersteigt.

3.1.4 Force Maps

In der vorliegenden Arbeit wurden elastische bzw. elektrostatische Eigenschaften der jeweiligen Proben lateral aufgelöst untersucht. Dazu wurde das AFM im *Force Mapping Modus* (Force Volume) betrieben [12]. Eine Force Map ist ein zweidimensionales Feld von Kraftkurven. Wie beim Abbilden wird der Cantilever zeilenweise über die untersuchte Probe gerastert. Während beim Abbilden aber für jeden Pixel nur die Piezoposition oder die Auslenkung des Cantilevers gespeichert wird, wird bei einer Force Map pro Bildpunkt eine komplette Kraftkurve aufgenommen. Zusätzlich wird die Höhe bei Maximalkraft, d. h. im untersten Punkt der Kraftkurve gespeichert. Aus den Kraftkurven werden nach dem Experiment der lokale Elastizitätsmodul bzw. Stärke und Länge der elektrostatischen Wechselwirkung berechnet, so daß man Elastizitäts- bzw. Elektrostatikbilder der untersuchten Probe erhält. Diese Auswertung der Kraftkurven wird im Kapitel Material und Methoden detailliert beschrieben.

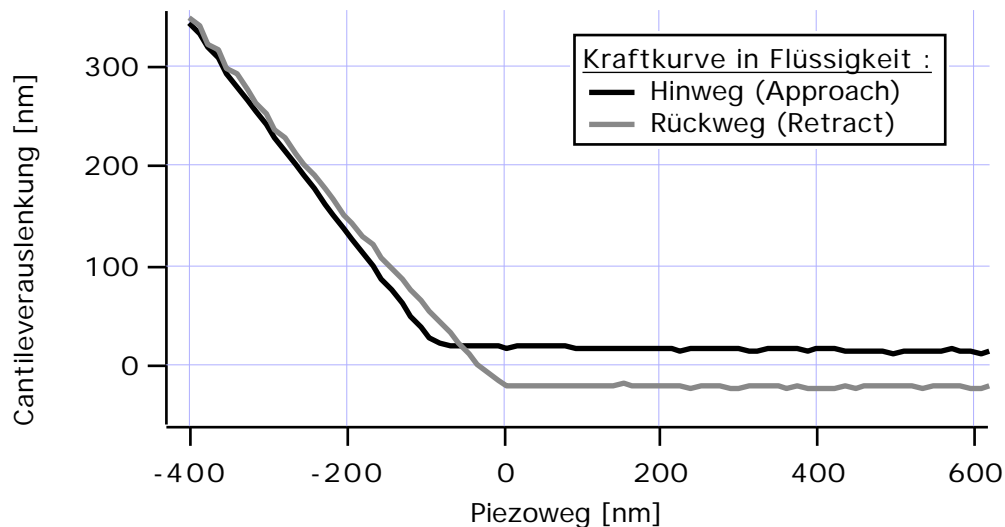


Abbildung 3.3: Kraftkurve, aufgenommen in Zellkulturmedium auf Substrat (Petrischale), Abtastrate 10Hz. Approach- und Retract-Teil liegen aufgrund hydromechanischer Wechselwirkung zwischen Cantilever und umgebender Flüssigkeit weit auseinander.

Insbesondere beim Arbeiten mit lebenden Zellen ist es wichtig, möglichst geringe Kräfte auf die Probe wirken zu lassen. Beim Force Mapping werden die Kraftkurven daher im sogenannten *Trigger-Mode* aufgenommen. Dieser bewirkt, daß jede einzelne Kraftkurve nur bis zu einer einstellbaren Maximalkraft (Triggerschwelle) durchfahren wird. Dazu variiert die Steuersoftware den z-Bereich der Kraftkurve so, daß zwischen oberstem und unterstem Punkt der Kraftkurve genau die entsprechende Differenz in den Auslenkungswerten auftritt. Die Gesamtlänge der Kraftkurve bleibt dabei immer gleich.

Force Mapping ist eine speicher- und zeitintensive Technik. Die Geschwindigkeit, mit der eine einzelne Kraftkurve aufgenommen werden kann, ist durch die hydromechanische Wechselwirkung des Cantilevers mit der umgebenden Flüssigkeit limitiert. Je größer die Geschwindigkeit ist, desto stärker wird der Cantilever beim Annähern an die Probe nach oben und beim Wegziehen nach unten ausgelenkt (Abbildung 3.3). Auf lebenden Zellen arbeitet man mit sehr weichen Cantilevern und sehr langen Kraftkurven von typischerweise $2\mu\text{m}$. Der Einfluß der Hydromechanik ist dann kritisch, so daß man nicht mehr als 10-15 Kraftkurven pro Sekunde aufnehmen sollte, um beim Auswerten reproduzierbare Elastizitätsmoduli zu erhalten. Bei 64×64 Kraftkurven entspricht das einer Aufnahmezeit von 15-20min pro Force Map. Force Maps mit höherer lateraler Auflösung können aufgrund zu hohen Speicherbedarfs nicht aufgenommen werden.

3.2 Versuchsaufbau

3.2.1 Zellexperimente

Für die Messungen an lebenden Zellen wurde ein kommerziell erhältliches Stand-Alone-AFM (BioScope, Digital Instruments, Santa Barbara, CA) [50] in Kombination mit einem invertierten optischen Mikroskop (Axiomat, Zeiss, Oberkochen) verwendet. Der Laser des AFM wird mit Hilfe einer Filterfolie ausgeblendet. Das optische Mikroskop ermöglicht eine exakte Positionierung der AFM-Spitze über einer bestimmten Zelle oder einem interessanten Gebiet. Abbildung 3.4 zeigt ein Bild des Cantilevers über einer Gruppe von Hühnerherzzellen, das mit einer ins Mikroskop eingebauten CCD-Kamera aufgenommen wurde .

Um die Zellen nicht zu zerstören, sollten die Cantilever möglichst kleine Federkonstanten und möglichst stumpfe Spitzen aufweisen. Bei den ersten Experimenten mit Hühnerherzzellen wurden Oxide Sharpened SiN_3 -Tips mit 20mN/m und 18° Öffnungswinkel (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) verwendet, später Park Microlever / Sharp Microlever (Park Scientific, Sunnyvale, CA) mit 8mN/m und 35° bzw. 18° Öffnungswinkel. Abbildung 3.5 veranschaulicht die geometrischen Verhältnisse eines Sharp Microlevers schematisch und mit Hilfe einer elektronenmikroskopischen

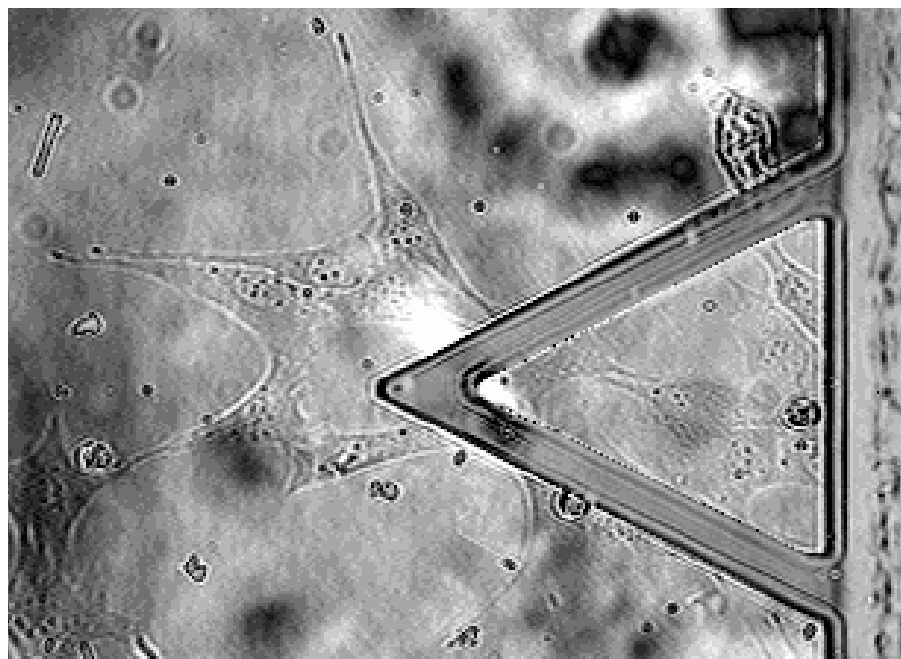


Abbildung 3.4: Cantilever über einer Gruppe von Hühnerherzzellen. Länge des Cantilevers etwa 200 μm , Breite der Arme 22 μm .

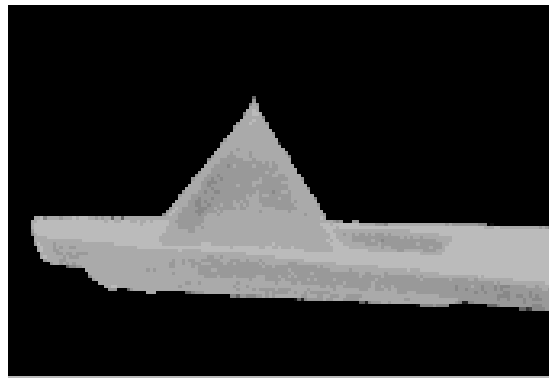
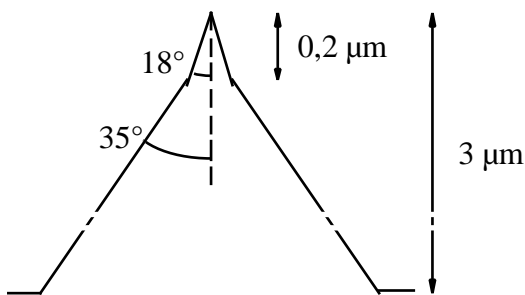


Abbildung 3.5: Abmessungen der pyramidenförmigen Spitze eines Park Sharp Microlever und elektronenmikroskopisches Bild der Spitze (aus dem mitgelieferten Datenblatt)

Aufnahme. Die Federkonstanten wurden durch eine Analyse des thermischen Rauschens bestimmt [51] und mit Referenzfedermessungen verifiziert [52]. Für alle weiteren Parameter wurden Herstellerangaben verwendet.

Der vollständige Versuchsaufbau ist in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt. Das BioScope steht auf dem Objektisch des invertierten Mikroskops. In dieser Konfiguration können lebende Zellen direkt in der Zellkulturpetrischale abgebildet werden. Der Cantilever wird dabei von einer Fluidzelle aus Plexiglas gehalten. Mit Hilfe eines selbstgebauten Halters wird die Petrischale magnetisch am Objektisch fixiert. Diese stabile Halterung schränkt die Schwingungsanfälligkeit des Systems ein und ermöglicht gleichzeitig ein einfaches laterales Verschieben der Petrischale von Hand.

Die gesamte Anordnung befindet sich in einer gasdichten Plexiglaskiste, die mit CO_2 geflutet werden kann. Der Objektisch ist von unten mit Hochlastwiderständen beheizbar. Damit können während des Experiments Umgebungsbedingungen aufrechterhalten werden, die für die Zellen optimal sind (37°C , 5% CO_2 in der Luft).

Die im Mikroskop befindliche CCD-Kamera ist mit einem Monitor, einem Videorecorder und einem Videodrucker verbunden, so daß die Experimente bequem beobachtet, dokumentiert und nachvollzogen werden können. Eine Isolation des Aufbaus von Trittschall und Gebäudeschwingungen wird erreicht, indem die gesamte Anordnung mit Gummischnüren an der Labordecke aufgehängt wird.

Beim Abbilden der Zellen im Kontaktmodus muß darauf geachtet werden, daß die Auflagekräfte während des gesamten Experiments niedrig bleiben. Die Kraft wird minimiert, indem die AFM-Spitze von der Probe abgehoben und danach durch schrittweises Erhöhen der Kraft wieder in Kontakt gebracht wird. Auch Kraftkurven sollten nur im niedrigen Kraftbereich aufgenommen werden. Typische Trigger-

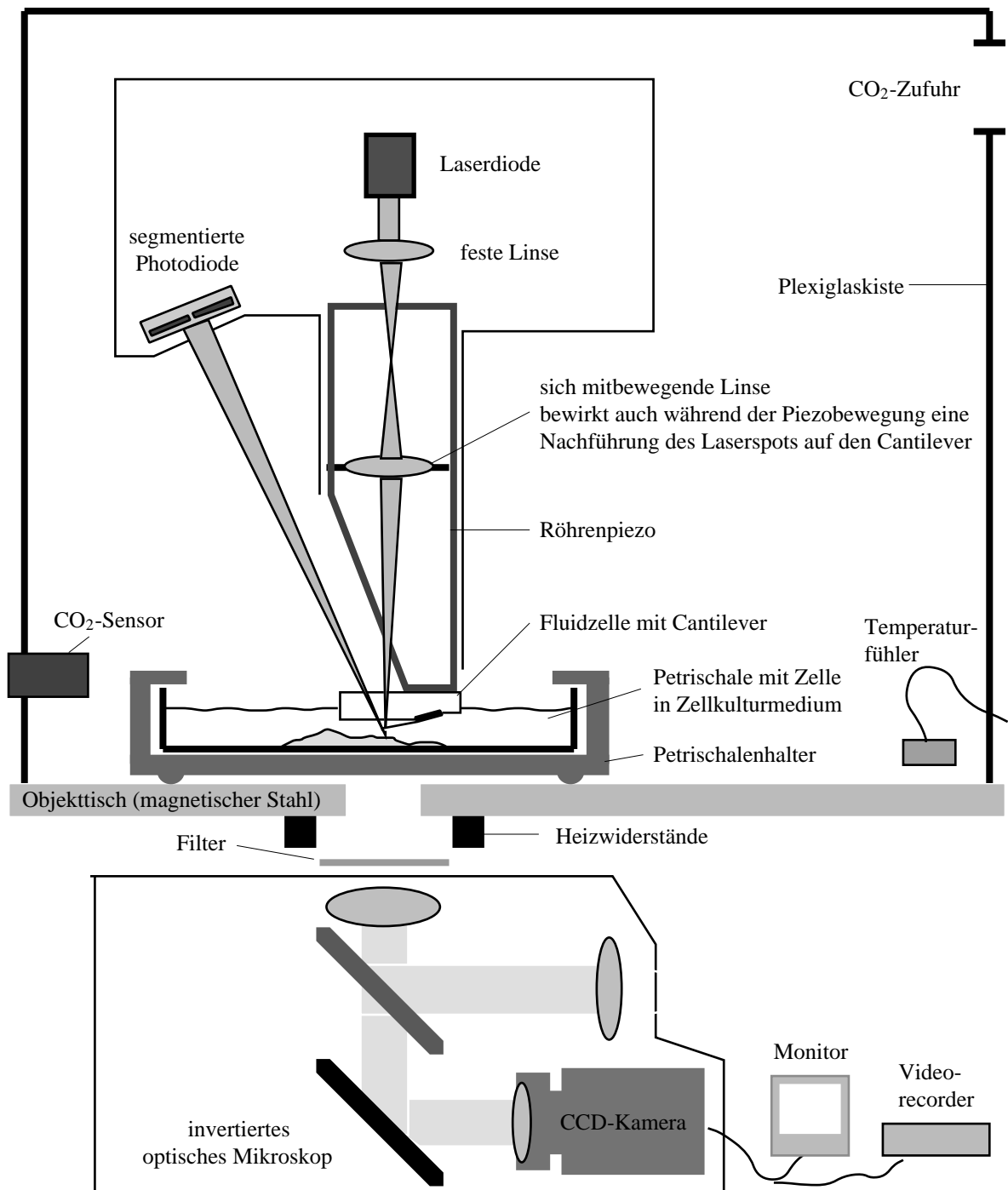


Abbildung 3.6: Versuchsaufbau: Ein Stand-Alone-AFM wird in Kombination mit einem invertierten optischen Mikroskop betrieben. Die Experimente werden an lebenden Zellen direkt im Zellkulturmedium durchgeführt. Temperatur und CO_2 -Gehalt der Luft in der Plexiglaskiste können reguliert werden.

schwellen beim Force Mapping liegen bei 60-120nm entsprechend 480-960pN. Die Kraftkurven sind dann 1-2 μm lang und können aufgrund der hydromechanischen Wechselwirkung zwischen Cantilever und Medium nur mit Abtastraten unterhalb 20Hz aufgenommen werden.

3.2.2 Elektrostatik

Die Messungen der elektrostatischen Eigenschaften geladener Oberflächen wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen AFM durchgeführt (NanoScope IIIa, Digital Instruments, Santa Barbara, CA), dessen Aufbau etwa dem in Abbildung 3.1 gezeigten Schema entspricht. Zwischen der Probe und dem Cantileverhalter (Fluidzelle) befindet sich ein durch einen Gummiring abgeschlossenes Flüssigkeitsvolumen von etwa 0,1ml. Die Flüssigkeit kann mittels Plastik-Einwegspritzen über Kanäle in der Fluidzelle ausgetauscht werden. Die verwendeten Siliziumnitridcantilever haben Federkonstanten von 20mN/m (Nanoprobes Oriented Twin Tips, Digital Instruments, Santa Barbara, CA) und wurden vor dem Experiment durch UV-Bestrahlung unter einer Quecksilberlampe gereinigt (Pen Ray Lamp, UVP, Upland, CA). Im Force-Mapping-Modus wurde das AFM mit typischen Triggerschwellen von 20-40nm bei 60-100nm langen Kraftkurven und lateralen Auflösungen von 64×64 oder 32×32 betrieben.

3.3 Berechnung der Elastizitätsmoduli

3.3.1 Definition

Ein quantitatives Maß für die Elastizität eines Materials ist sein Elastizitäts- oder Young-Modul. Seine Definition ist eine verallgemeinerte Form des Hooke'schen Gesetzes. Der Elastizitätsmodul ergibt sich aus der Spannung (Kraft/Fläche) und der Dehnung eines Körpers (Längenänderung/Länge) und trägt somit die Einheit Pascal:

$$= E \quad (2)$$

Eine Übersicht über die Elastizitäten verschiedener Materialien gibt Abbildung 3.3.7 [53-55]. Während die Elastizitätsmoduli sehr harter Materialien wie z. B. Stahl größer als 100GPa sind, sind lebende Zellen 7-8 Größenordnungen weicher und gehören mit 0,3-50kPa zu den weichsten bekannten Materialien. Der Zoom-In im unteren Teil der Abbildung zeigt, daß die Elastizitäten bei verschiedenen Zelltypen, auf unterschiedlichen Regionen einer Zelle oder in Abhängigkeit vom metabolischen Zustand

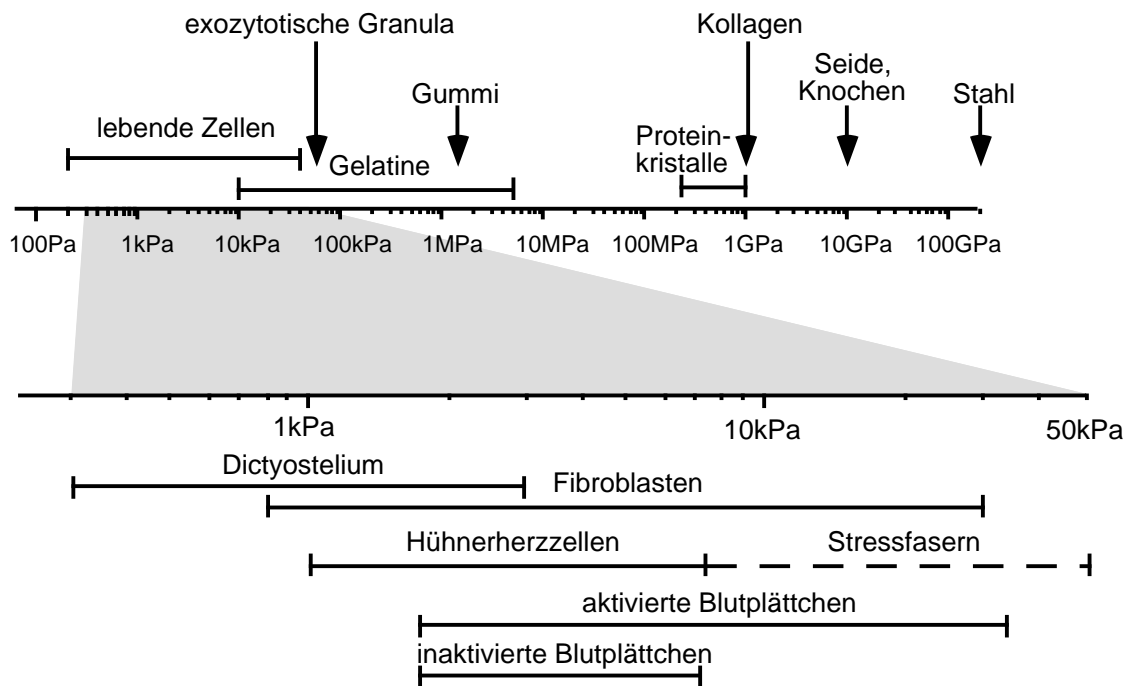


Abbildung 3.3.7: Übersicht über die Elastizitätsmoduli verschiedener Materialien. Im oberen Teil der Figur sind Literaturwerte aufgeführt, der Zoom-In im unteren Teil zeigt Elastizitäten lebender Zellen, die u. a. im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurden.

der Zelle variieren können. Die härtesten biologischen Materialien wie Seide oder Knochen haben Young-Moduli zwischen 10 und 30 GPa. Kollagen mit 1 GPa ist ein typisches Beispiel für die Elastizität von Proteinen. Selbst die Elastizitätsmoduli von Silikon oder eines sehr weichen Gummis liegen oberhalb von 1 MPa.

3.3.2 Hertz-Modell

Um aus dem Verlauf einer Kraftkurve den lokalen Elastizitätsmodul der Probe berechnen zu können, benötigt man ein geeignetes Modell. Dazu werden zunächst vereinfachende Annahmen über die Geometrie von Probe und Spitze gemacht. Daraus resultierende Einschränkungen in der Zuverlässigkeit der berechneten Elastizitätsmoduli werden in den Kapiteln 3.3.6 und 5.3 diskutiert.

Die verwendeten AFM-Spitzen sind pyramidenförmig, wobei die eigentliche Spitze durch eine aufgesetzte Halbkugel mit einem Krümmungsradius von 10-20 nm ersetzt ist. Aufgrund der großen Eindrückungen bei Experimenten an lebenden Zellen (mehrere 100 nm) kann das Vorhandensein dieser Halbkugel vernachlässigt werden.

Bei der Auswertung der Kraftkurve wird die AFM-Spitze als kegelförmig angenommen und die Zelle als homogener elastischer Halbraum betrachtet. Nach Sneddon's

Modifikation des Hertz-Modells kann das Problem der Eindrückung elastischer Körper für diese einfache Geometrie analytisch gelöst werden [56,57]. Das Modell liefert folgenden einfachen Zusammenhang zwischen der aufgewandten Kraft F und der Eindrückung :

$$F = \frac{2}{3} \tan(\alpha) \frac{E}{(1-\nu^2)} z^2 \tag{3}$$

Hier ist E der Elastizitätsmodul, ν bezeichnet die Poissonzahl ($\nu=0,5$ für inkompressible Materialien [58]) und α ist der halbe Öffnungswinkel des Konus.

3.3.3 Theoretischer Verlauf einer Kraftkurve

Im Kontaktteil einer Kraftkurve auf einer harten Probe ist die Auslenkung des Cantilevers $d(z)$ gleich dem Piezoweg z . Der Anstieg der Kurve ist also 1. Auf einer weichen Probe ist die Auslenkung des Cantilevers bei gleichem Piezoweg geringer, weil die AFM-Spitze um eine Strecke $\delta(z)$ in die Probe eingedrückt wird:

$$d(z) = z - \delta(z) \tag{4}$$

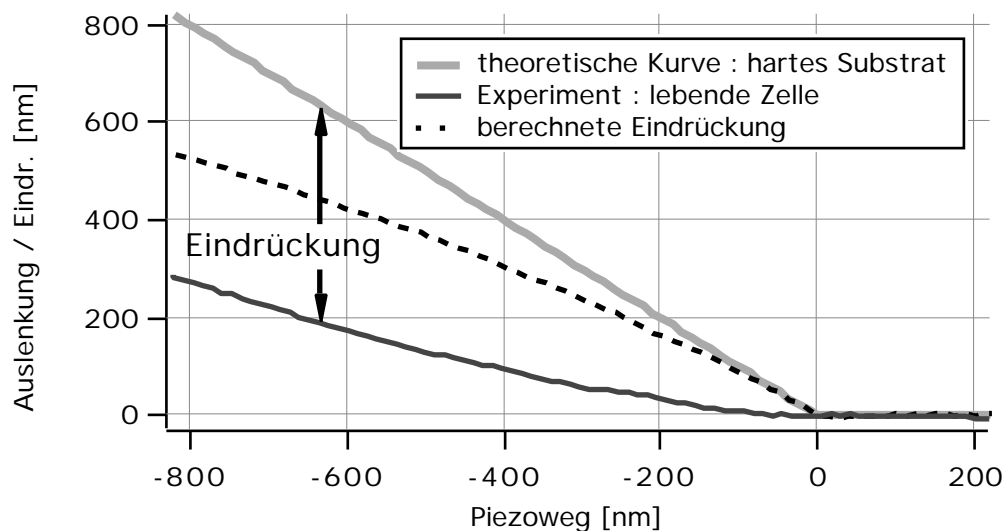


Abbildung 3.8: Vergleich zweier Kraftkurven auf harter Unterlage bzw. auf einer weichen Probe (Zelle). Die Kraftkurve auf der Zelle ist flacher und verläuft im Kontaktteil nichtlinear. Die Differenz zwischen beiden Kraftkurven ist die Eindrückung .

Der Anstieg der Kraftkurve ist dann variabel, bleibt aber immer kleiner als 1.

Die Eindrückung lässt sich punktweise als Differenz zwischen der theoretischen Auslenkung auf einer harten Unterlage und der gemessenen Auslenkung ermitteln (vgl. Abbildung 3.8).

Die Auflagekraft erhält man durch Multiplikation der gemessenen Auslenkung mit der Federkonstanten des Cantilevers:

$$F(z) = k_c \cdot d(z) \quad (5)$$

Ersetzt man nun $F(z)$ und $d(z)$ in Gleichung (3), erhält man einen theoretischen Ausdruck für den Verlauf einer Kraftkurve, der nur noch die gemessenen Größen z und $d(z)$ enthält:

$$z = d(z) + \sqrt{\frac{k_c \cdot d(z)}{\frac{2}{\tan(\alpha)} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)}}} \quad (6)$$

Die Federkonstante des Cantilevers wurde über thermische Rauschspektren [51] sowie mittels Referenzfedern [52] gemessen. Die Poissonzahl ist ein Maß dafür, wie stark sich ein Material senkrecht zur angelegten Kraft ausdehnt. Das Zytosol wird als inkompressibel angenommen, woraus sich eine Poissonzahl von $\nu=0,5$ ergibt [58]. Werte für den Öffnungswinkel der Spitze wurden Datenblättern des Herstellers entnommen.

Somit ist der Elastizitätsmodul E der einzige explizit in Gleichung (6) enthaltene freie Parameter. Die Gleichung beschreibt allerdings nur den Teil der Kraftkurve, in dem die Spitze in Kontakt mit der Probe ist. Die Werte für z und $d(z)$ repräsentieren also nur die entsprechenden Abweichungen vom Kontaktpunkt $P_0=[z_0, d_0]$. Gleichung (6) wird deshalb verallgemeinert zu:

$$z - z_0 = d(z) - d_0 + \sqrt{\frac{k_c \cdot (d(z) - d_0)}{\frac{2}{\tan(\alpha)} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)}}} \quad (7)$$

Diese allgemeine Gleichung für den Verlauf einer Kraftkurve enthält die drei freien Parameter z_0 , d_0 und E . Durch einen Fit der gemessenen Kraftkurven mit dieser Gleichung wird also nicht nur der lokale Elastizitätsmodul E der Probe, sondern auch die Position z_0 des Kontaktpunktes der Kraftkurve, also die ungestörte Höhe der Probe ermittelt.

3.3.4 Algorithmus zur Auswertung der Kraftkurven

Sowohl der Anstieg der Kraftkurve als auch die Lage des Kontaktpunktes werden durch hydromechanische Wechselwirkung des Cantilevers mit der umgebenden Flüssigkeit beeinflusst (vgl. Kapitel 3.1.4, Abbildung 3.3). Um diesen Einfluß in nullter Ordnung auszuschalten, wird für die Berechnungen eine aus Annäherungs- und Wegfahrkurve gemittelte Kraftkurve verwendet. Auf diese Weise erhält man für Kraftkurven, die mit nicht zu hohen Geschwindigkeiten aufgenommen wurden (Abtastrate bis zu 15Hz), reproduzierbare Werte für den Elastizitätsmodul und den Kontaktpunkt. Vor der eigentlichen Auswertung der Kraftkurven müssen die Anstiege geeicht werden. Dafür werden Referenzkraftkurven benötigt, die auf hartem Substrat aufgenommen wurden. Im Kontaktteil dieser Kurven ist die Auslenkung gleich dem Piezoweg (vgl. Kapitel 3.1.3). Kraftkurven auf weichen Proben sind im Vergleich flacher. Bei den Zellexperimenten werden die Force Maps so aufgenommen, daß der gewählte Bildausschnitt neben der untersuchten Zelle auch Teile der Petrischale enthält. Die Eichung erfolgt, indem alle Auslenkungswerte der Force Map mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden, der so gewählt wird, daß der Anstieg der steilsten Kurven im Kontaktteil 1 beträgt. Enthält der Bildausschnitt kein Substrat, kann alternativ vor oder nach dem Experiment mit unveränderten Parametern eine Referenz-Force-Map auf der Petrischale oder auf Glas aufgenommen werden.

Im ersten Schritt des Auswertalgorithmus wird die Auslenkung des Cantilevers in Ruhelage d_0 direkt ermittelt, um die Anzahl der Parameter in Gleichung (7) von drei auf zwei zu reduzieren. Dies geschieht durch Mittelung über die Auslenkungswerte der oberen 5 Punkte jeder Kraftkurve. Beim Experimentieren muß deshalb darauf geachtet werden, daß jede Kraftkurve ihren Kontaktpunkt enthält. Das erreicht man durch eine geeignete Wahl der Kraftkurvenlänge und der Triggerschwelle (vgl. Kapitel 3.1.4). Die optimalen Werte hängen von den Cantileverkenngroßen (Federkonstante, Öffnungswinkel, Form) und dem minimalen Elastizitätsmodul der Probe ab.

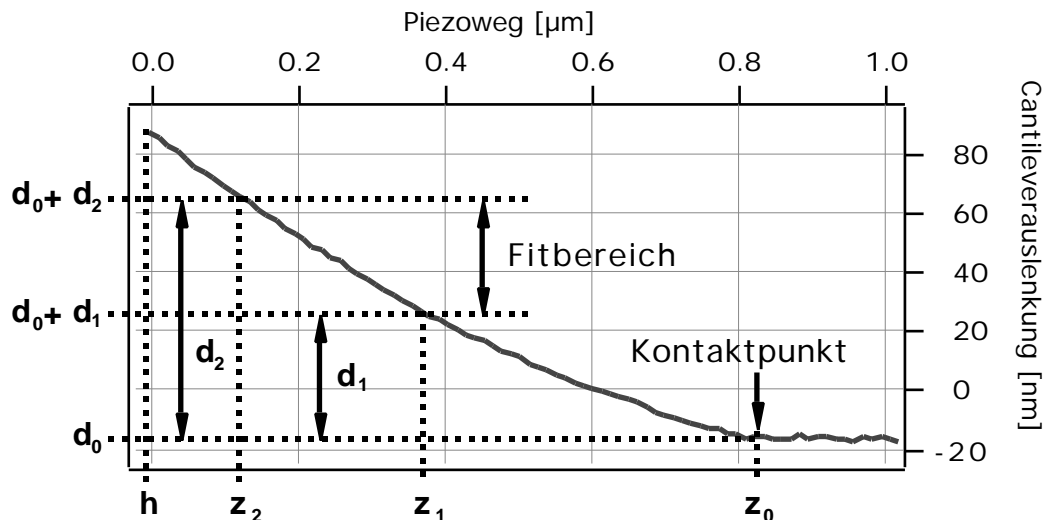


Abbildung 3.9: Beispielkraftkurve zur Veranschaulichung der Fitparameter. Der Fit erfolgt nicht über den gesamten Kontaktteil der Kurve, sondern nur im Fitbereich $[d_0+d_1, d_0+d_2]$.

Unter Verwendung dieses Werts für d_0 wird im zweiten Schritt des Auswertalgorithmus eine theoretische Kraftkurve gemäß Gleichung (7) an die gemessenen Daten gefittet, um den Kontaktpunkt z_0 zu bestimmen. Dieser Fit erfolgt nicht über den gesamten Kontaktteil der Kraftkurve, sondern nur in einem beliebig wählbaren Bereich von Auslenkungswerten $[d_0+d_1, d_0+d_2]$ (siehe Abbildung 3.9). Die Wahl dieses *Fitbereichs* muß an die jeweilige experimentelle Situation angepaßt werden (siehe Kapitel 3.3.6).

Um eine höhere Genauigkeit des berechneten Elastizitätsmoduls zu erreichen, wird der Algorithmus zweimal durchlaufen. Im dritten Schritt wird ein genauere Wert für d_0 berechnet, indem diesmal über alle Punkte oberhalb von z_0 (d. h. rechts von z_0 in Abbildung 3.9) gemittelt wird.

Der vierte Schritt ist eine Wiederholung des zweiten, wobei nun der genauere Wert für d_0 verwendet wird, um den Elastizitätsmodul der Probe an der untersuchten Stelle zu berechnen.

Ergebnisse dieser Auswertung sind der lokale Elastizitätsmodul E sowie die Position z_0 des Kontaktpunktes innerhalb der Kraftkurve. Bei einer Force Map wird neben den Kraftkurven auch die absolute Lage h der jeweils unteren Punkte der Kraftkurven gespeichert (siehe Kapitel 3.1.4). Damit läßt sich nun die absolute Position des Kontaktpunktes $h_0=h+z_0$ berechnen, d. h. bei der Auswertung einer Force Map erhält man neben dem *Elastizitätsbild* ein topographisches Bild der Probe bei Auflagekraft null, also ein *reales Höhenbild*.

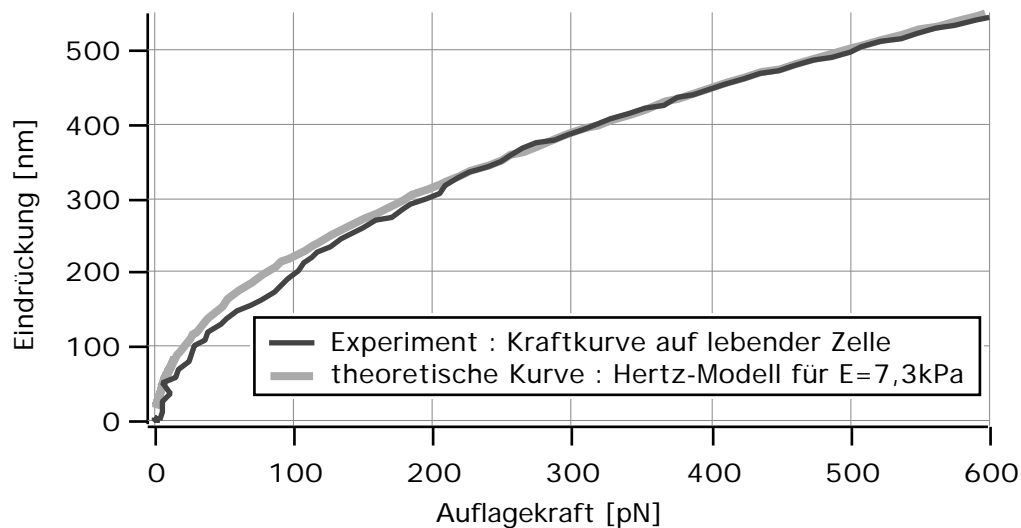


Abbildung 3.10: Auswertung einer Kraftkurve. Die Auswertung ergab hier einen Elastizitätsmodul von 7,3kPa. Das Hertz-Modell (grau) beschreibt die Meßwerte (schwarz) gut.

Abbildung 3.10 zeigt das Ergebnis einer solchen Auswertung. Aufgetragen ist hier die Auflagekraft F gegen die Eindrückung δ . Gemäß Gleichung (3) ergibt sich zwischen diesen Größen ein quadratischer Zusammenhang (graue Kurve). Die schwarze Kurve zeigt die experimentellen Werte, die mit Hilfe der Gleichungen (4) und (5) aus der Kraftkurve ermittelt wurden. Die Auswertung ergab an dieser Stelle einen Elastizitätsmodul von 7,3kPa. Man beobachtet eine gute Übereinstimmung zwischen experimentellen Daten und dem theoretischen Verlauf.

3.3.5 Fehleranalyse

Bei allen vier Schritten des Auswertalgorithmus ist das thermische und elektronische Rauschen in den jeweils betrachteten Punkten bzw. Bereichen der Kraftkurven eine mögliche Fehlerquelle. Zusätzlich entstehen Abweichungen durch die Mittelung der Annäherungs- und Wegfahr-Teile der Kraftkurven, die aber durch Reduzierung der Rastergeschwindigkeit bei der Aufnahme der Force Maps minimiert werden können. In der folgenden Simulation werden diese Fehler vernachlässigt.

Im zweiten und vierten Schritt des Auswertalgorithmus können durch fehlerhafte Eichung des Anstiegs der Kraftkurven Abweichungen verursacht werden (vgl. Kapitel 3.3.4). Die Auswirkung einer ungenauen Eichung auf die berechneten Elastizitätsmoduli wurde bereits von J. Domke untersucht [52]. Hier soll geprüft werden, wie sich ein im zweiten Schritt des Algorithmus falsch berechneter Kontaktpunkt z_0 auf das Ergebnis des Elastizitätsmoduls auswirkt.

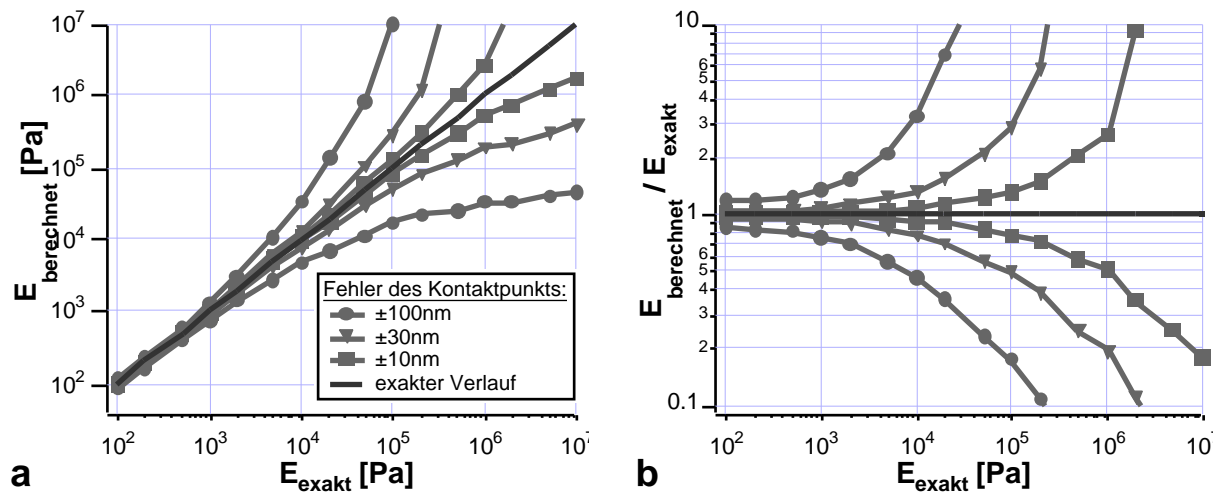


Abbildung 3.11: Auswirkung einer fehlerhaften Berechnung des Kontaktpunktes auf die berechneten Elastizitätsmoduli (Fitbereich [20nm,50nm], $k=8\text{mN/m}$, $\alpha=35^\circ$). Für größere Elastizitätsmoduli nimmt die prozentuale Abweichung stark zu.

Um diese Frage zu klären, wurde eine Simulation programmiert, die für verschiedene Elastizitätsmoduli theoretische Kraftkurven berechnet, deren Verlauf dem Hertz-Modell (Gleichung (7)) exakt entspricht. Die verwendeten Cantilverkenngroßen entsprechen den Parametern der auch im Experiment eingesetzten Park Microlever (Federkonstante $k=8\text{mN/m}$, Öffnungswinkel der Spitze $\alpha=35^\circ$). Bei der Auswertung der theoretischen Kurven wurde die bekannte Position des Kontaktpunktes z_0 systematisch um bestimmte Beträge variiert und statt des in Schritt 2 bestimmten Wertes für die Berechnung der Elastizitätsmoduli verwendet. Das Ergebnis dieser Simulation ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

Bei der Interpretation der Abbildung 3.11 ist zu berücksichtigen, daß die Kontaktpunkte von Kraftkurven auf harten Materialien sehr gut definiert sind und auf wenige Nanometer genau bestimmt werden können, da der Übergang vom Off-Surface-Teil zum Kontaktteil (vgl. Kapitel 3.1.3) abrupt erfolgt. Auf weichen Proben erfolgt dieser Übergang allmählich, so daß z. B. auf Zellen bei der Berechnung von z_0 Fehler in der Größenordnung von 100nm auftreten können. Dieses Verhalten kompensiert die Divergenz der Fehler der berechneten Elastizitätsmoduli bei härteren Proben, so daß für einen großen Bereich der Probenelastizität eine zuverlässige Messung der elastischen Eigenschaften möglich ist.

Im Gegensatz dazu wirkt sich der Fehler der Steigung um so weniger aus, je flacher die Kraftkurven sind [52]. Die Steigungen hängen von den Federkonstanten der verwendeten Cantilever und von den Öffnungswinkeln der AFM-Spitzen ab. Insgesamt

ist die Genauigkeit der berechneten Elastizitätsmoduli also am höchsten, wenn möglichst weiche Cantilever mit möglichst stumpfen Spitzen eingesetzt werden. Dabei muß allerdings ein Kompromiß gefunden werden, denn für weiche Cantilever ist der Einfluß des thermischen Rauschens und der hydromechanischen Wechselwirkung größer und durch die Verwendung stumpfer Spitzen reduziert sich die laterale Auflösung. Die praktische Erfahrung zeigt, daß sehr genaue Fits an die Kraftkurven möglich sind, wenn die Federkonstanten der Cantilever im Bereich der effektiven Federkonstanten der Probe liegen, d. h., wenn die Anstiege der Kraftkurven etwa 1/2 betragen.

Diese Simulation berücksichtigt nur Fehler, die bei der Analyse von Kraftkurven entstehen, die den vom Hertz-Modell vorhergesagten Verlauf haben. Fälle, in denen das Modell die experimentelle Situation nur ungenügend beschreibt, werden in den Kapiteln 3.3.6 und 5.3 diskutiert.

3.3.6 Wahl des Fitbereichs

Die Voraussetzungen des Hertz-Modells beinhalten starke geometrische Vereinfachungen und umfangreiche Restriktionen hinsichtlich der Eigenschaften von Spitze und Probe. Bei der Anwendung des Modells muß daher immer geprüft werden, ob und wie gut das jeweilige System diese Voraussetzungen erfüllt. Aus den Abweichungen von diesen Voraussetzungen ergeben sich Einschränkungen in der Zuver-

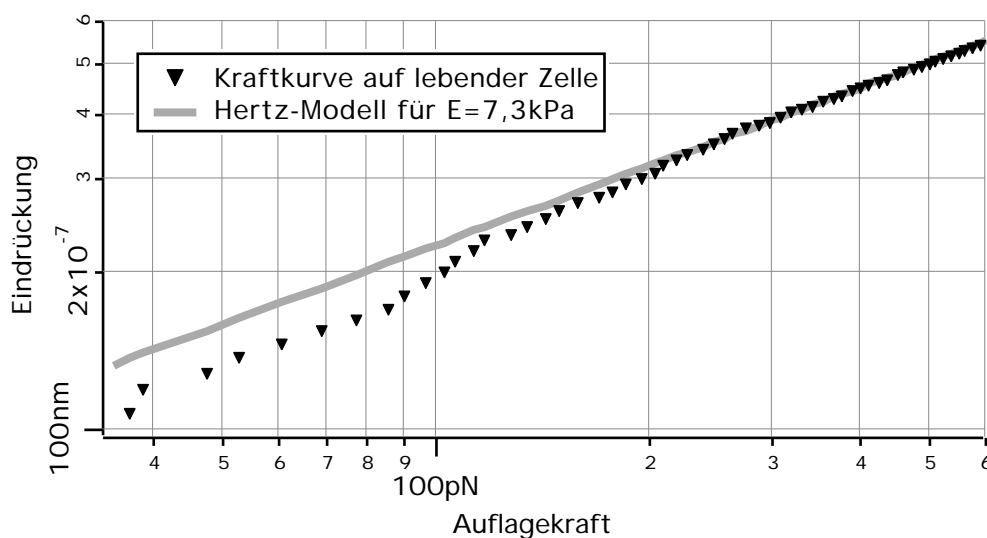


Abbildung 3.12: Auswertung einer Kraftkurve: gleicher Datensatz wie in Abbildung 3.10 in doppelt logarithmischer Darstellung. Bei sehr kleinen Eindrückungen beschreibt das Hertz-Modell (grau) die experimentelle Situation (schwarze) nur unzureichend.

lässigkeit der berechneten Elastizitätsmoduli und Kontaktpunkte, die bei der Interpretation der Messungen berücksichtigt werden müssen.

Die Wahl des Fitbereichs hat einen starken Einfluß auf die Anwendbarkeit des Hertz-Modells [59]. Durch das Weglassen sehr kleiner Auslenkungswerte wird vermieden, daß Punkte oberhalb des (noch unbekannten) Kontaktpunktes z_0 mit in die Rechnung einbezogen werden. In diesem sogenannten Off-Surface-Teil der Kraftkurve kann der Cantilever frei schwingen und die Amplitude des thermischen Rauschens ist wesentlich größer als im Kontaktteil.

Ein noch wichtigerer Vorteil ist, daß der Bereich der Kraftkurve ausgeklammert wird, in dem die vereinfachenden Annahmen des Hertz-Modells über die Geometrie des Systems (Kapitel 3.3.2) die realen geometrischen Verhältnisse nur unzureichend beschreiben. Bei kleinen Auslenkungswerten sind die Eindrückungen so klein, daß die Halbkugelform des äußersten Endes der AFM-Spitze berücksichtigt werden müßte [52]. Das ist in Abbildung 3.12 verdeutlicht. Hier ist der schon in Abbildung 3.10 gezeigte Datensatz noch einmal doppelt logarithmisch dargestellt. Während für große Auflagekräfte, also für große Auslenkungswerte Experiment und Modell hervorragend übereinstimmen, ergeben sich bei kleinen Auslenkungen deutliche Abweichungen.

Je größer die Obergrenze des Fitbereichs gewählt wird, desto tiefer innerhalb der Probe befindliche Schichten haben einen Einfluß auf die gemessenen Elastizitäts-

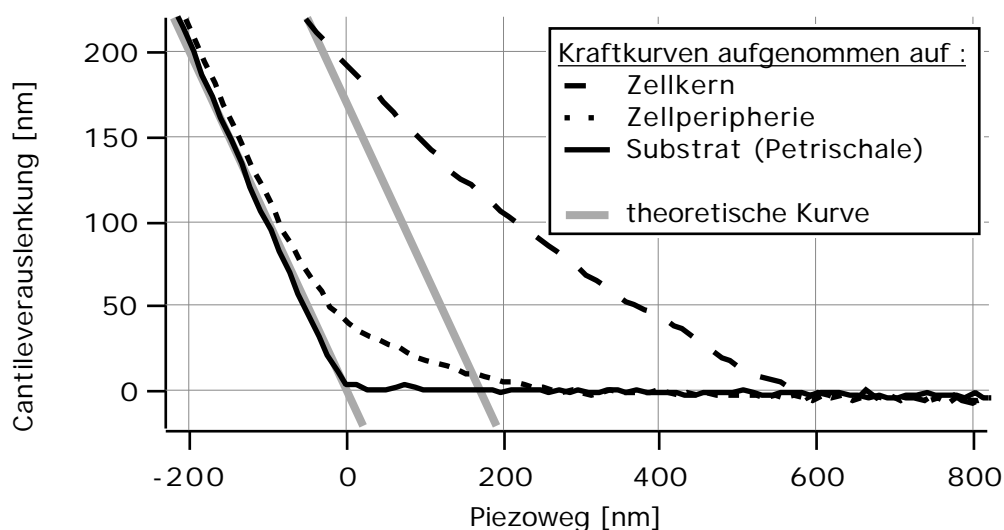


Abbildung 3.13: Beispielkraftkurven auf Zellkern, dünnem Lamellipodium und Substrat. Die auf dem Lamellipodium aufgenommene Kurve beinhaltet nur im Bereich niedriger Kräfte Information über die elastischen Eigenschaften der Zelle.

werte. Im Extremfall sehr dünner Schichten wird die AFM-Spitze so weit in die Probe eingedrückt, daß diese vollständig komprimiert wird. Es ergibt sich dann eine Kraftkurve, die im Kontaktteil bei kleinen Auslenkungswerten zunächst flach verläuft und die elastischen Eigenschaften der dünnen Probe widerspiegelt. Bei höheren Kräften nimmt der Einfluß des darunter liegenden Substrats zu und der Anstieg der Kraftkurve nähert sich dem Wert 1 an. Hier dominieren die elastischen Eigenschaften des Substrats den Verlauf der Kurve. Abbildung 3.13 zeigt drei Beispielkraftkurven. Die in der Peripherie einer Zelle aufgenommene Kurve (kurze Striche) verläuft zunächst ähnlich wie eine Kurve, die in der Nähe des Zellkerns aufgenommen wurde (lange Striche), nähert sich dann aber dem Verlauf einer Kurve auf dem Substrat an (durchgezogene Linie). Die Kurven wurden um die bei Maximalkraft gemessenen Höhen lateral gegeneinander verschoben, so daß die Lage der Kontaktpunkte die realen Höhen der untersuchten Regionen angibt.

Eine der Voraussetzungen des Hertz-Modells ist eine unendlich dicke, weiche Probe. Das Modell kann allerdings auch auf dünne Filme angewandt werden, solange die Eindrückung in die Probe ausreichend klein im Verhältnis zur Probendicke ist. Das

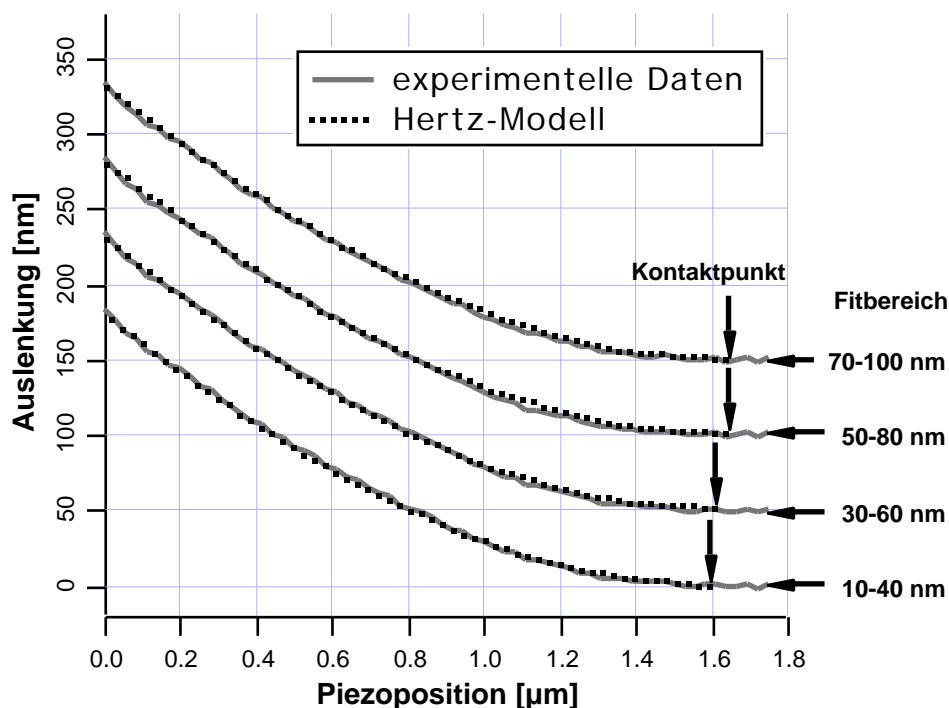


Abbildung 3.14: Typische Kraftkurve auf einer dickeren Stelle einer Zelle, in vier verschiedenen Fitbereichen ausgewertet (Fitbereich ist rechts angegeben, waagerechte Pfeile: Auslenkung 0, senkrechte Pfeile: Kontaktpunkte). Das Hertz-Modell beschreibt den Kurvenverlauf gut, und verlässliche Werte für Kontaktpunkt und Elastizitätsmodul (Abbildung 3.16) können unabhängig vom Fitbereich berechnet werden.

wird in Abbildung 3.14 demonstriert. Eine Beispielkraftkurve, aufgenommen auf einer etwa 2µm dicken Stelle einer Zelle, wurde in vier verschiedenen Fitbereichen ausgewertet (die waagerechten Pfeile zeigen Auslenkung 0 an). Die berechneten Kontaktpunkte (senkrechte Pfeile) und Elastizitätsmoduli (siehe Abbildung 3.16) unterscheiden sich nur minimal.

Auf Lamellipodien gibt es dagegen Stellen, die nur 200-300nm dick sind, so daß die Eindrückung im Bereich der Probendicke liegt. Wie in Abbildung 3.13 erläutert, dominieren dann bei großen Kräften die elastischen Eigenschaften des Substrats. Die berechneten Elastizitätsmoduli stellen daher nur eine Obergrenze der tatsächlichen Werte dar. Fits an eine Beispielkraftkurve in verschiedenen Auslenkungsbereichen sind in Abbildung 3.15 gezeigt. Nur im niedrigsten Fitbereich ($d_1=10$, $d_2=40$ nm) ergibt die Auswertung einen Kontaktpunkt an einer Stelle, wo die Auslenkung noch nicht sichtbar von null abweicht. Man kann daraus schließen, daß der Einfluß des Substrats am niedrigsten ist, wenn solche Kraftkurven im kleinstmöglichen Auslenkungsbereich gefittet werden. Nur dann erhält man auch zuverlässige Werte für den Kontaktpunkt, d. h. für die reale Höhe der Probe.

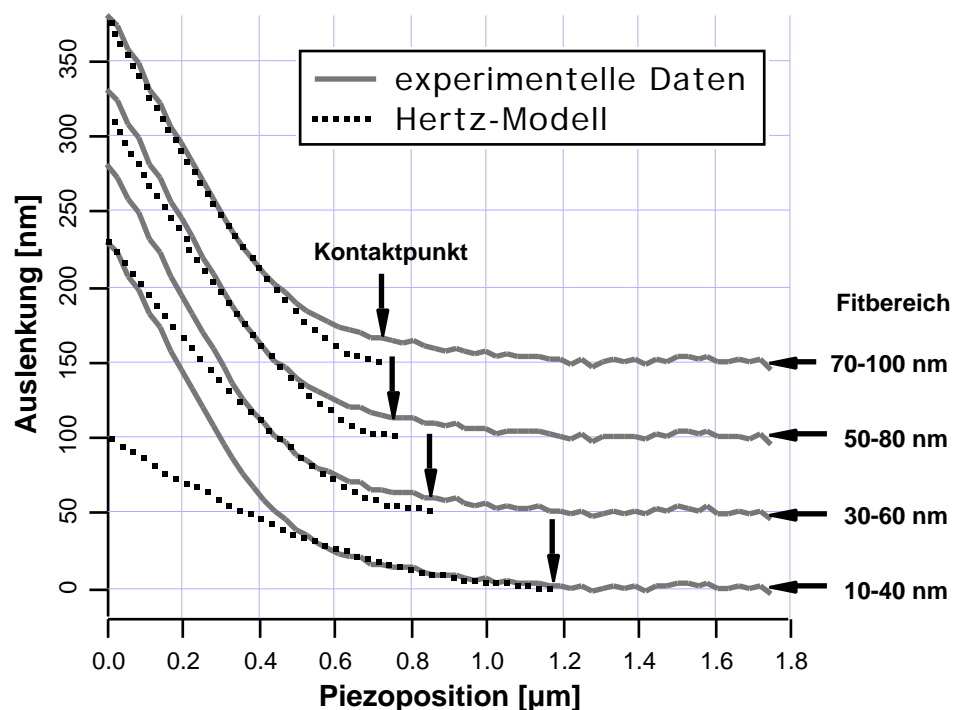


Abbildung 3.15: Typische Kraftkurve auf einer sehr flachen Stelle einer Zelle (Lamellipodium), in vier verschiedenen Fitbereichen ausgewertet (Fitbereich ist rechts angegeben, waagerechte Pfeile: Auslenkung 0, senkrechte Pfeile: Kontaktpunkte). Das Hertz-Modell beschreibt den Kurvenverlauf für geringe Auslenkungen nur im niedrigsten Fitbereich gut. Die berechneten Werte für Kontaktpunkt und Elastizitätsmodul können Abbildung 3.16 entnommen werden.

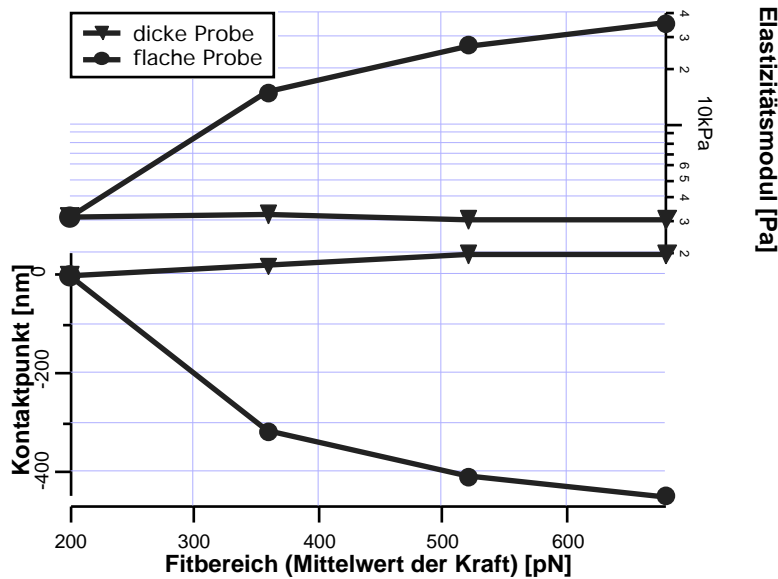


Abbildung 3.16: Abhängigkeit der für die Kraftkurven in Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15 berechneten Elastizitätsmoduli und Kontaktpunkte vom Fitbereich. Die Werte sind gegen die mittlere Auflagekraft des Fitbereichs aufgetragen.

Die Abhängigkeit der gemessenen Elastizitätsmoduli vom Fitbereich, d. h. vom Mittelwert der entsprechenden Auflagekräfte, ist in Abbildung 3.16 verdeutlicht. Man erkennt, daß die berechneten Werte für dickere Stellen der Zelle unabhängig vom Fitbereich sind, während sich für flache Lamellipodien eine deutliche Abhängigkeit ergibt. Deshalb wird insbesondere bei Experimenten an kriechenden Zellen, bei denen die Untersuchung solcher flacher Lamellipodien im Vordergrund steht, zur Auswertung der niedrigstmögliche Fitbereich verwendet (typischerweise 10-40nm entsprechend 80-320pN), um den Einfluß des Substrats zu minimieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei der Anwendung des Hertz-Modells und bei der Interpretation der Ergebnisse darauf geachtet werden muß, daß die Voraussetzungen des Modells erfüllt sind. Die Untergrenze des Fitbereichs d_1 muß Kraftbereiche ausschließen, in denen die konkrete Spitzengeometrie relevant wird und sollte bei typischen Werten für Zellelastizität, Federkonstante und Rastergeschwindigkeit 10nm nicht unterschreiten. Die Obergrenze des Fitbereichs d_2 kann der jeweiligen experimentellen Zielsetzung angepaßt werden. Hohe Werte ermöglichen eine Untersuchung tiefer gelegener Schichten, verfälschen aber auf flachen Proben die berechneten Elastizitätsmoduli durch den Einfluß des darunterliegenden Substrats. Auch die Verletzung anderer Voraussetzungen des Hertz-Modells muß gegebenenfalls berücksichtigt werden. Ein Beispiel, bei dem die Homogenität der Probe nicht mehr gewährleistet ist, wird in Kapitel 5.3 diskutiert.

4. Elektrostatik

Aufgrund des sehr komplexen Aufbaus lebender Zellen ist bei AFM-Experimenten die Wechselwirkung zwischen Spitze und Zelle durch ein Zusammenwirken verschiedener Kraftbeiträge gekennzeichnet. Deshalb wurden zunächst Versuche an einem einfachen Modellsystem durchgeführt, um die Wechselwirkung zwischen der AFM-Spitze und der Zellmembran zu charakterisieren. Statt der Zellmembran, deren Hauptbestandteil eine Lipiddoppelschicht mit eingebetteten Proteinen ist, wurden festkörperunterstützte Lipidschichten verwendet. Auf diese Weise konnten zunächst elastische Beiträge vernachlässigt werden, die auf lebenden Zellen von entscheidender Bedeutung sind. Die Experimente wurden nicht im Zellkulturmedium, sondern in einfachen Elektrolytlösungen durchgeführt. In diesem System dominiert die elektrostatische Wechselwirkung zwischen AFM-Spitze und Probe. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten die elektrostatischen Oberflächeneigenschaften erstmals mit hoher Ortsauflösung gemessen werden. Bei den Zellexperimenten wird die Elektrostatik jedoch aufgrund der höheren Pufferkonzentration im Zellkulturmedium fast vollständig abgeschirmt und spielt daher eine vernachlässigbare Rolle.

Das AFM ist ein Instrument, das sich u. a. zur Messung sehr kleiner Kräfte eignet. So wurden z. B. Kräfte zwischen einzelnen Molekülen in der Größenordnung von 100pN [46], aber auch Adhäsionskräfte [48,49], Hydratationskräfte [60] und elektrostatische Kräfte [47,61,62] gemessen. Ein Problem, das dabei auftritt, ist die unzureichend definierte Spitzengeometrie, die es sehr schwierig macht, Daten zu standardisieren und Messungen mit verschiedenen AFM-Spitzen zu vergleichen. Durch das Aufkleben von Silica-Kugeln mit definierten Durchmessern auf den Cantilever kann dieses Problem auf elegante Weise umgangen werden [63,64]. Dabei reduziert sich allerdings die erreichbare laterale Auflösung, so daß hier stattdessen versucht werden sollte, lokale Wechselwirkungen unter Verwendung handelsüblicher AFM-Spitzen zu messen.

4.1 Kolloidale Kräfte

Die totale Wechselwirkung zwischen der AFM-Spitze und einer flachen Oberfläche setzt sich aus mehreren Beiträgen zusammen (siehe Abbildung 4.1). Das Überlappen der Elektronenschalen von Spitzen- und Probenatomen führt aufgrund des Pauli-Prinzips zur Hardcore-Abstoßung. Experimente mit dem Surface Force Apparatus

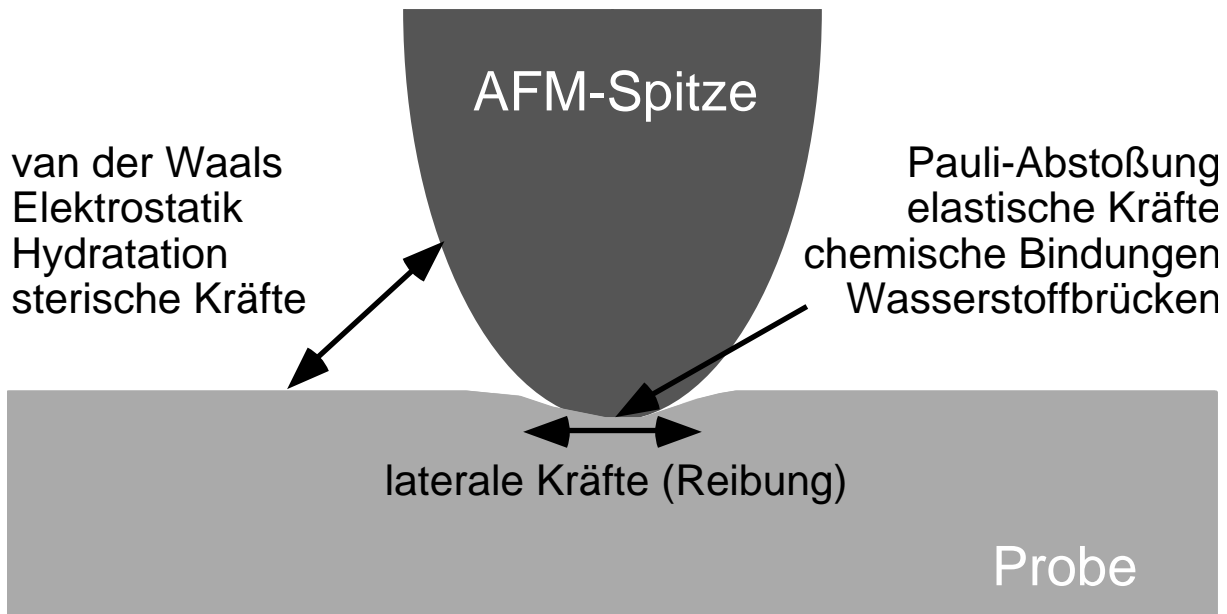


Abbildung 4.1: Wechselwirkungskräfte zwischen AFM-Spitze und Probe. Hardcore- oder Pauli-Abstoßung und van-der-Waals-Kraft wirken immer. Die anderen Kräfte treten nur unter bestimmten Bedingungen auf und hängen von Systemparametern ab.

(SFA) haben gezeigt, daß zwischen geladenen Oberflächen in Elektrolytlösung van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte (in Elektrolyten als Double-Layer-Kräfte) sowie strukturelle Kräfte die Wechselwirkung dominieren [65,66]. Die Kraftgesetze und die Materialkonstanten wurden zwar sowohl theoretisch berechnet als auch experimentell gemessen, jedoch setzt die Anwendung dieser Zusammenhänge die genaue Kenntnis der geometrischen Verhältnisse voraus. Diese Kenntnis ist im Fall des SFA gegeben, bei dem wohldefinierte gekrümmte Oberflächen miteinander in Kontakt gebracht werden, wobei der Abstand interferometrisch gemessen wird. Das AFM mit seiner wenige Nanometer großen Spitze kann eingesetzt werden, um die Wechselwirkungskräfte auf nahezu atomarer Skala zu untersuchen. Da die Spitzengeometrie auf der Nanometer-Skala jedoch unbekannt und schwer zu messen ist, kann man die bekannten Kraftgesetze nur eingeschränkt zur Interpretation der Daten anwenden. Wie schon oben erwähnt wurde, gibt es Möglichkeiten, dieses Problem zu umgehen wenn die laterale Auflösung keine Rolle spielt. Hier stand jedoch die Untersuchung der Wechselwirkung mit bestmöglicher lateraler Auflösung im Vordergrund.

Als kolloidale Kräfte bezeichnet man die Summe verschiedener individueller Kräfte wie van-der-Waals-Kraft, elektrostatische Double-Layer-Kraft und Hydratationskraft (die im folgenden nicht berücksichtigt wird). Van-der-Waals-Kräfte zwischen makro-

skopischen Körpern können mit Hilfe der Derjaguin-Näherung beschrieben werden. Das Kraftgesetz für eine Kugel, die in Kontakt mit einer planaren Oberfläche gebracht wird, lautet dann:

$$F(d) = \frac{H R}{3} \left(\frac{1}{d^2} - \frac{r_0^6}{d^8} \right) \quad (1)$$

Dabei bezeichnen H die Hamaker-Konstante, R den Radius der Kugel, d den Abstand zwischen Kugel und Ebene und r_0 den kleinsten Abstand zwischen den Atomen (im folgenden wird $r_0=1\text{\AA}$ angenommen). Die Summe aus Double-Layer-Kraft und van-der-Waals-Kraft wird in der Kolloidphysik häufig als DLVO-Kraft (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) bezeichnet. Im Vakuum ist H immer positiv und die van-der-Waals-Wechselwirkung immer attraktiv. Das gilt aber nicht notwendigerweise für Systeme aus zwei Körpern und einem dazwischen befindlichen Medium. Für das hier untersuchte System (Glimmer - Wasser - Siliziumnitrid) ist die Wechselwirkung Literaturwerten für die Hamaker-Konstante zufolge attraktiv [67].

Elektrostatische Wechselwirkung kann für einfache Geometrien (z. B. planar) exakt beschrieben werden als Lösung der sogenannten Poisson-Boltzmann-Gleichung. Oft muß jedoch eine Linearisierung dieser Gleichung benutzt werden, die als Debye-Hückel-Theorie bezeichnet wird. Dabei wird von kleinen Oberflächenpotentialen ausgegangen, was für Glimmer allerdings nicht unbedingt zutreffend ist. Die Debye-Hückel-Theorie sagt einen Potentialverlauf voraus, bei dem die elektrostatische Kraft exponentiell abklingt. Im planaren Fall gilt:

$$\psi(x) = \psi_0 e^{-\frac{x}{\lambda_D}} \quad (2)$$

Hier ist x der Abstand von der Oberfläche, ψ_0 bezeichnet das Potential an der Oberfläche ($x=0$) und λ_D ist die charakteristische Abklinglänge des Potentials (die sogenannte Debye-Länge). Für die Debye-Länge gilt:

$$\lambda_D = \frac{1}{\kappa} = \frac{1}{\sqrt{\sum_i \frac{c_i z_i^2}{2 \epsilon_0 \epsilon_r k T}}} \quad (3)$$

Dabei sind mit c_i die Konzentrationen und mit z_i die Valenzen aller beteiligten Ionen bezeichnet, e ist die Elementarladung, ϵ_r die relative Dielektrizitätskonstante, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante, k die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur. Die Summe umfaßt Kationen und Anionen.

Man kann zeigen, daß die Kraft zwischen einer kugelförmigen Spitze und einer ebenen Oberfläche ebenfalls exponentiell abnimmt, wobei die Abklinglänge die Debye-Länge ist [61]. Dieser Zusammenhang wird im folgenden bei der Analyse der gemessenen Kräfte zwischen AFM-Spitze und Probe angewandt. Die Theorie wird dabei einfach gehalten, da das Hauptziel der Versuche war, die elektrostatischen Kräfte mit hoher lateraler Auflösung zu kartieren.

4.2 Einfluß der Elektrostatik auf AFM-Bilder

Zur Untersuchung der lateralen Auflösung bei der Messung der elektrostatischen Wechselwirkung wurden Oberflächen verwendet, die eine auf sehr kleiner Skala strukturierte Ladungsverteilung aufweisen. Dazu wurden aus einer Vesikellösung Lipiddoppelschichten mit positiver Oberflächenladung auf eine negativ geladene Glimmeroberfläche adsorbiert (siehe Anhang A.4).

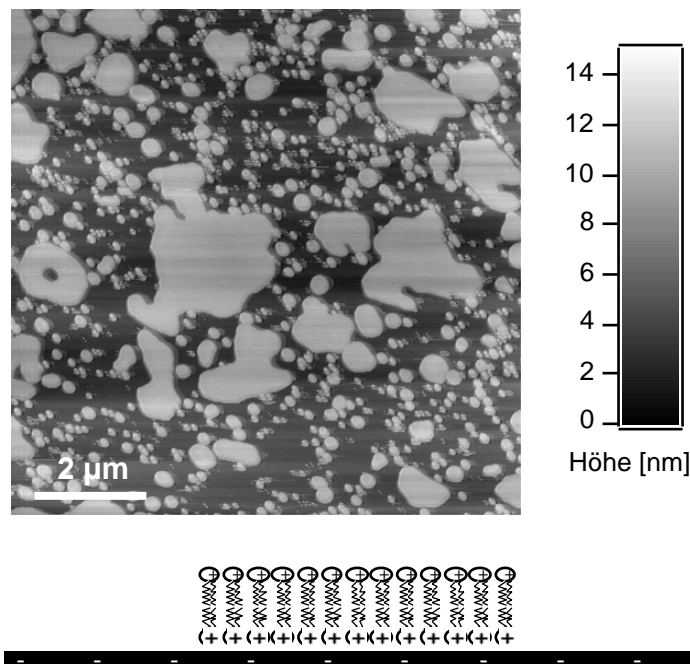


Abbildung 4.2: AFM-Bild einer mit DODAB-Patches beschichteten Glimmeroberfläche. In wäßriger Lösung bilden die positiv geladenen Kopfgruppen der Lipide und der negativ geladene Glimmer eine bezüglich ihrer Oberflächenladung strukturierte Oberfläche (siehe Schema).

Abbildung 4.2 zeigt ein AFM-Bild im Kontaktmodus von DODAB-Patches auf Glimmer, das in reinem Wasser aufgenommen wurde. Die Höhe der DODAB-Doppelschichten beträgt etwa 5nm, was der doppelten Länge eines einzelnen Lipidmoleküls entspricht. Gelegentlich wurden 10nm hohe Patches beobachtet, die aus zwei Lipiddoppelschichten bestehen. Man findet Patches mit Durchmessern zwischen einigen 10nm und mehreren μm .

Zwei typische Annäherungs- und Wegfahrkurven von Kraftkurven auf DODAB und Glimmer sind in Abbildung 4.3a dargestellt. Die elektrostatische Abstoßung zwischen der negativ geladenen Siliziumnitridspitze und dem ebenfalls negativ geladenen Glimmer führt dazu, daß der Cantilever schon vor Erreichen der Probenoberfläche nach oben ausgelenkt wird. Analog wirkt attraktive Elektrostatik zwischen der AFM-Spitze und der positiv geladenen Lipidoberfläche. Gleichung (2) wird angewandt, um mit Hilfe eines einfachen Exponentialfits (punktierte Linien) die charakteristische Abklinglänge der Kraft und den Betrag der Kraft an der Oberfläche zu berechnen. Die laterale Verschiebung der Kraftkurven um 5nm relativ zueinander entspricht der Höhe des Lipidpatches. Abbildung 4.3b zeigt die zugehörigen Wegfahrkurven. Auf dem DODAB-Patch tritt aufgrund starker Adhäsion zwischen Spitze und Probe eine große Hysterese auf.

Den Einfluß elektrostatischer Oberflächeneigenschaften auf AFM-Bilder wird in Abbildung 4.4 anhand von Bildern demonstriert, die bei verschiedenen Auflagekräften aufgenommen wurden. Beim Abbilden mit Kräften oberhalb der Kraft im Kontaktpunkt für repulsive Elektrostatik (etwa 70pN in Abbildung 4.3a) ist die Spitze immer in

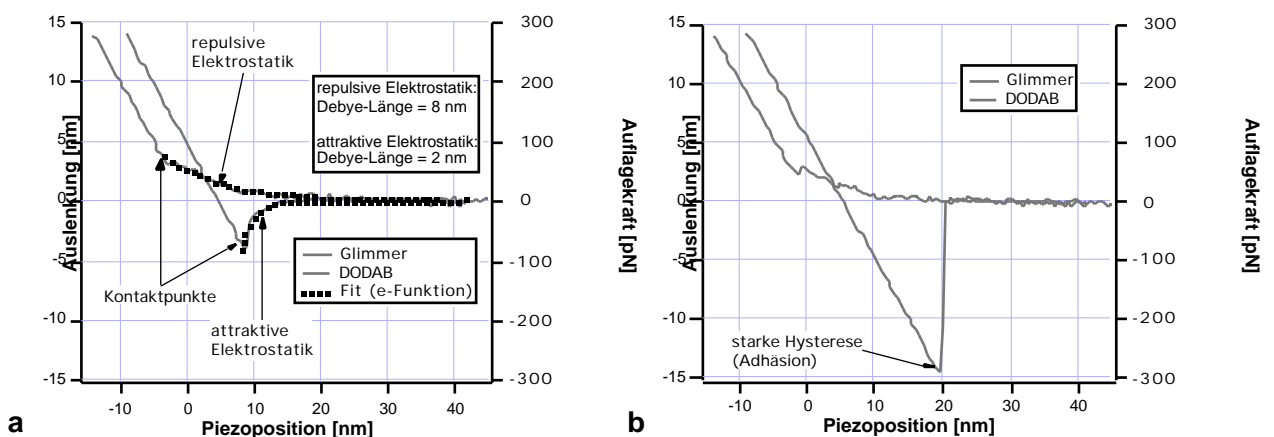


Abbildung 4.3: Typische Kraftkurven auf DODAB bzw. Glimmer in 1mM LiNO_3 . (a) Annäherungskurven. Ein Exponentialfit liefert gemäß Gleichung (2) Stärke und Abklinglänge der elektrostatischen Wechselwirkung, wenn alle anderen Kräfte vernachlässigt werden. (b) Wegfahrkurven. Auf DODAB tritt zwischen AFM-Spitze und Probe starke Adhäsion auf.

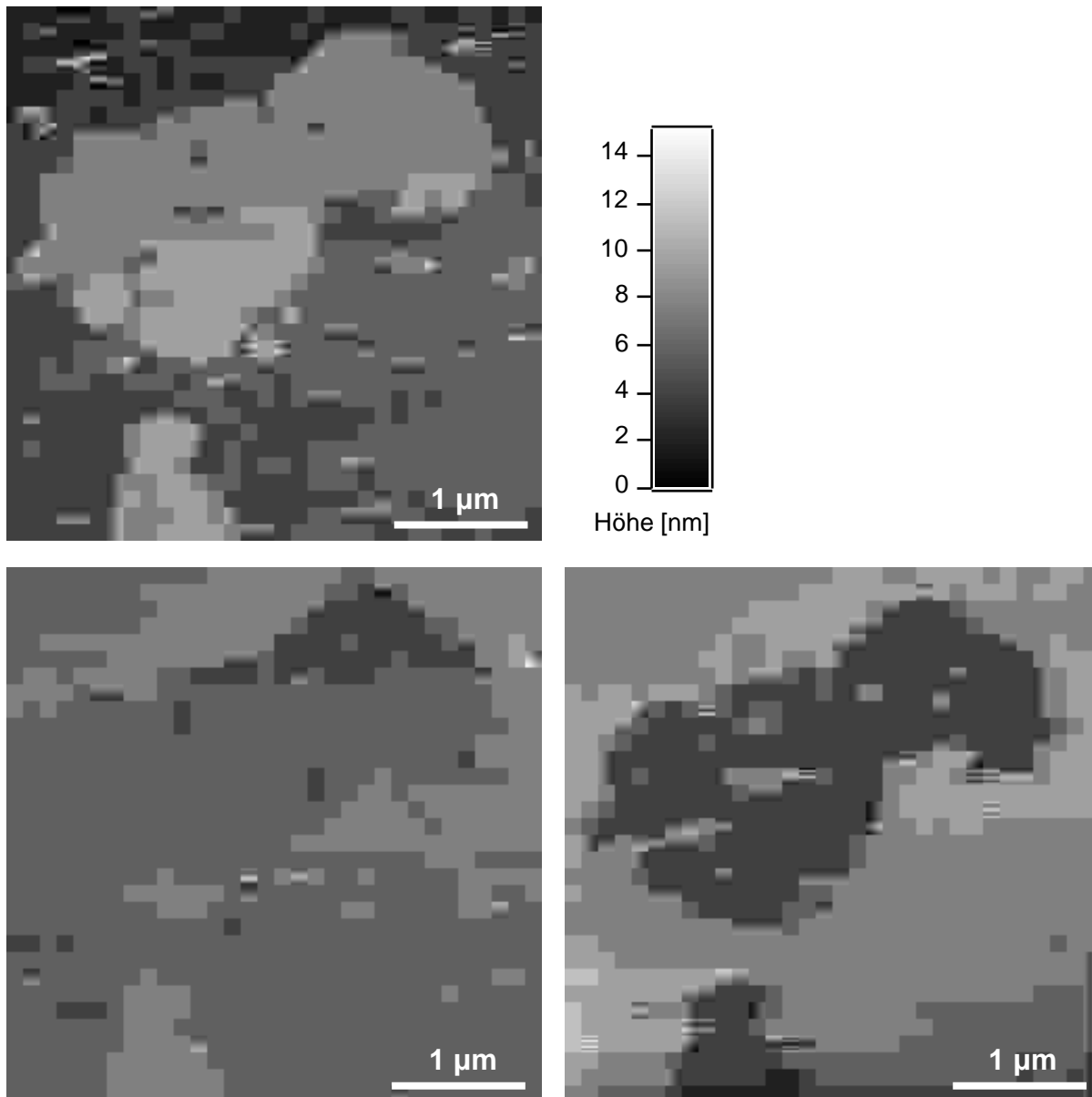


Abbildung 4.4: AFM-Bilder eines DODAB-Patches in 5mM LiCl bei verschiedenen Auflagekräften. (a) Realer topographischer Kontrast bei hoher Auflagekraft. (b) Verfälschter Kontrast bei mittlerer Kraft. Driften der Kraft zu höheren Werten während der Bildaufnahme (von oben nach unten) ändert den Kontrast innerhalb des Bildes. (c) Kontrastumkehr bei sehr niedriger Kraft. Erklärung im Text.

Kontakt mit der Probe und man erhält echten topographischen Kontrast (Abbildung 4.4a).

Sind die Auflagekräfte niedriger als die repulsive elektrostatische Wechselwirkung, wird die AFM-Spitze von der Glimmeroberfläche weggedrückt, so daß während der Abbildung kein Kontakt zustande kommt. Aufgrund der attraktiven Wechselwirkung ist die Spitze dagegen immer in Kontakt mit der Oberfläche der DODAB-Patches. Wird die AFM-Spitze um mehr als 5nm von der Glimmeroberfläche weggedrückt, erscheint diese im AFM-Bild höher als die DODAB-Patches, und man beobachtet

Kontrastumkehr (Abbildung 4.4c). Dieser Fall tritt ein, wenn die Auflagekraft niedriger ist als die Kraft, bei der sich die Kurven in Abbildung 4.3a schneiden (etwa 40pN).

Bei mittleren Kräften wird die Spitze weniger als 5nm weit von der Glimmeroberfläche weggedrückt, so daß der Kontrast zwar verfälscht, aber nicht umgekehrt wird. Abbildung 4.4b zeigt ein solches Bild. Hier driftete während der Aufnahme des Bildes, die von oben nach unten erfolgte, die Auflagekraft zu höheren Werten, so daß aus anfänglich invertiertem Kontrast normaler (aber nicht notwendigerweise topographisch exakter) Kontrast wurde.

Abbildungen im repulsiven Wechselwirkungsbereich wurden bereits in der Literatur beschrieben [68-70]. Dabei wurden insbesondere die Minimierung der Auflagekraft durch teilweise Kompensation durch repulsive Elektrostatik und die Möglichkeit fehlerhafter Höhenmessung diskutiert [70,71] (siehe auch Abbildung 4.4). In den hier gezeigten Experimenten konnte erstmalig eine Unterscheidung strukturiert geladener Oberflächen in Form einer Kartierung der elektrostatischen Eigenschaften durchgeführt werden.

4.3 Laterale Auflösung

Die Abbildung 4.5 zeigt eine Zeile von Kraftkurven aus einer Force Map, die in 5mM LiNO₃ auf einem auf Glimmer adsorbierten DODAB-Patch aufgenommen wurde. Bei den Kurven im mittleren Teil der Zeile beobachtet man im Annäherungs-Teil (a) at-

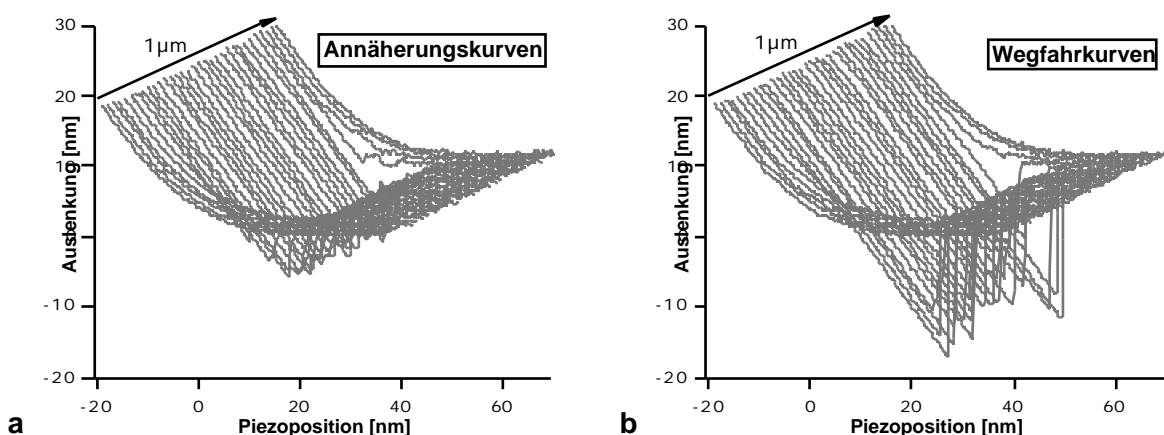


Abbildung 4.5: Eine Zeile von (a) Approach- und (b) Retract-Teilen von Kraftkurven, entnommen einer Force Map, die auf einem DODAB-Patch auf Glimmer in 5mM LiNO₃ aufgenommen wurde. (a) Unterschiede in der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der AFM-Spitze und dem Lipid (Mitte der Zeile) einerseits und der Spitze und Glimmer (rechts und links) andererseits sind deutlich zu sehen. (b) Nur auf DODAB tritt Adhäsion zwischen Spitze und Probe auf, auf Glimmer wird die attraktive van-der-Waals-Wechselwirkung von repulsiver Elektrostatik kompensiert.

traktive Wechselwirkung und im Wegfahr-Teil (b) starke Adhäsion. Das zugehörige Höhenbild zeigt, daß sich in diesem Bereich DODAB befindet. In den Kurven auf Glimmer in den äußeren Bereichen der Zeile ist die elektrostatische Wechselwirkung repulsiv und es tritt keine Hysterese auf. Der Übergang von Glimmer zu DODAB erfolgt abrupt, d. h. von einer Kurve zur nächsten.

In Abbildung 4.6 wird die Auswertung der Kraftkurven einer Force Map demonstriert. Verschiedene Größen werden aus den Kraftkurven berechnet und können dann als Grauwerte codiert und im Bildformat dargestellt werden. Im Höhenbild (a) ist die Topographie des untersuchten DODAB-Patches zu sehen. Die Höhe von 5nm entspricht der doppelten Moleküllänge von DODAB. Damit ist bewiesen, daß es sich hier um eine Doppelschicht des Lipids handelt. Die Adhäsionskraft (b) liegt auf dem Patch zwischen 300 und 600pN. Zwischen der AFM-Spitze und Glimmer tritt dagegen praktisch keine Adhäsion auf. Die Stärke der elektrostatischen Wechselwirkung

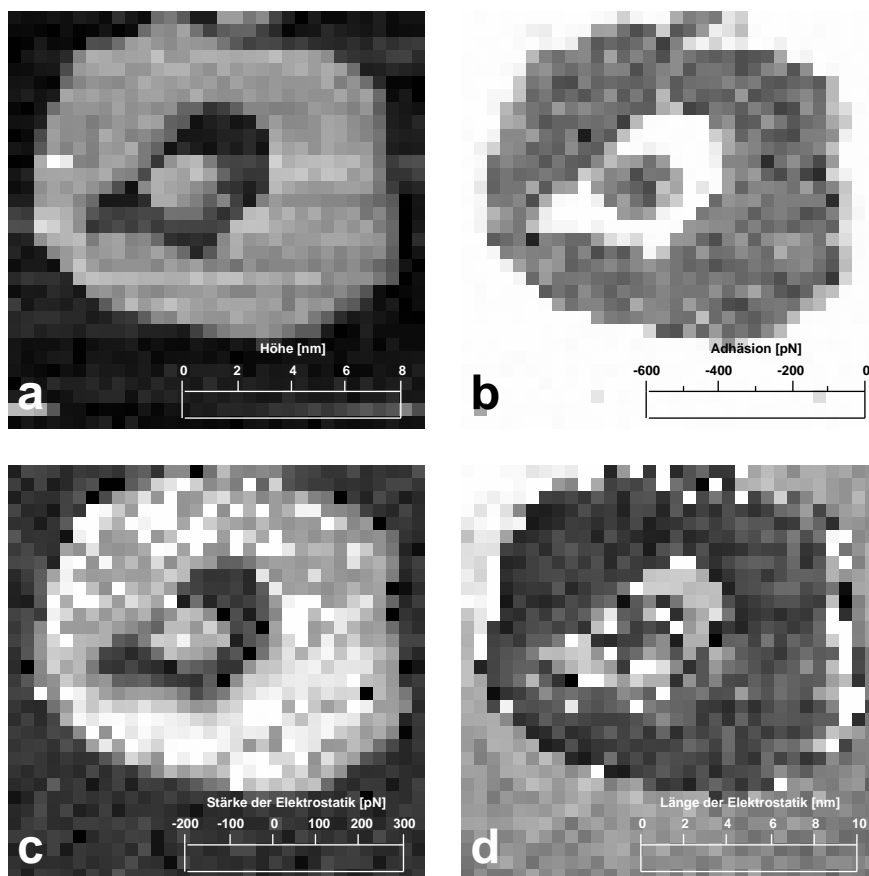


Abbildung 4.6: Auswertung einer Force Map, die auf einem DODAB-Patch auf Glimmer in 5mM LiNO₃ aufgenommen wurde. (a) Topographie, der DODAB-Patch ist ca. 5nm hoch. (b) Adhäsion, d. h. „Stärke“ der Hysterese in den Wegfahrkurven (siehe Abbildung 4.3b). (c) Stärke und (d) Abklinglänge der elektrostatischen Wechselwirkung (ϵ_0 und ϵ in Gleichung (2)), bestimmt durch einen einfachen Exponentialfit wie in Abbildung 4.3a.

beträgt auf DODAB etwa +200pN (attraktiv) und auf Glimmer etwa -300pN (repulsiv). Auf dem Patch beträgt die Abklinglänge der Wechselwirkung ca. 2-3nm, auf Glimmer dagegen 6-8nm. An den Kanten des Patches werden z. T. Abklinglängen berechnet, die mehrere Größenordnungen zu hoch sind (weiße Pixel in (d)). Ursache dafür sind Kraftkurven, die nur geringfügige elektrostatische Effekte zeigen. Das ist darauf zurückzuführen, daß auf die AFM-Spitze hier gleichzeitig attraktive Kräfte vom DODAB und repulsive Kräfte vom Glimmer wirken.

Abbildung 4.7 zeigt, wie die laterale Auflösung bei der Messung elektrostatischer Kräfte mit dem AFM bestimmt wird. Hier wurde eine Zeile von 32 Kraftkurven analysiert, die im Abstand von je 17nm auf einem etwa 400nm breiten auf Glimmer adsor-

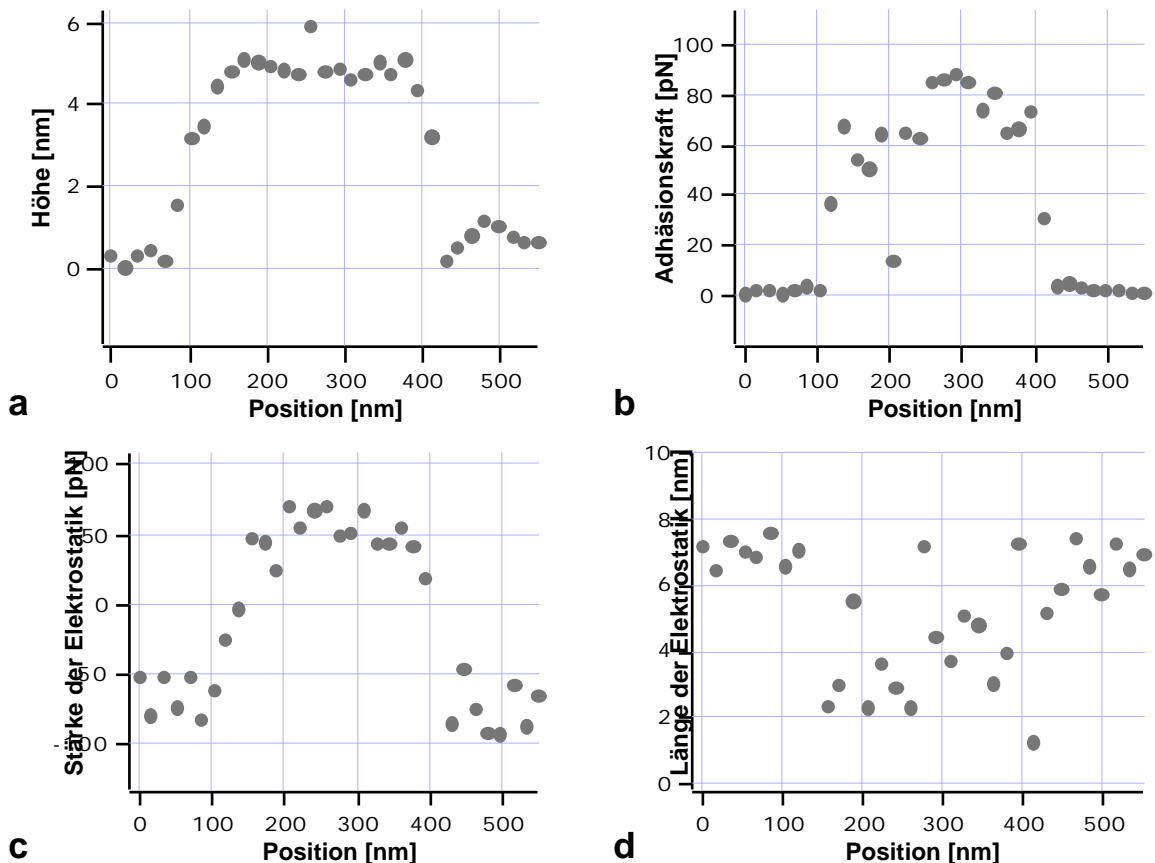


Abbildung 4.7: Auswertung einer Zeile von Kraftkurven (32 Kraftkurven auf 550nm, d. h. 17nm zwischen benachbarten Kurven), entnommen einer Force Map, die auf einem DODAB-Patch auf Glimmer in 5mM LiCl aufgenommen wurde. (a) Topographie, (b) Adhäsion, (c) Stärke und (d) Abklinglänge der elektrostatischen Wechselwirkung. Topographie und Adhäsion werden in direktem physikalischen Kontakt zwischen AFM-Spitze und Probe gemessen und zeigen deutliche Sprünge am Rand des DODAB-Patches. Elektrostatische Wechselwirkung beeinflusst die AFM-Spitze bereits, wenn sie die Probe noch nicht berührt. Die Änderung der charakteristischen Größen am Rand des Patches ist daher weniger sprunghaft. Der Übergang findet auf etwa 50nm statt (rechter Rand in (d)), die laterale Auflösung als FWHM dieses Übergangs beträgt also 25nm.

bierten DODAB-Patch in 5mM LiCl aufgenommen wurden. Das Höhenprofil (a) zeigt, daß der Patch in der Mitte der 550nm langen Zeile liegt. Rechts und links davon wurden noch einige Kraftkurven auf Glimmer aufgenommen. Bei den Größen, die in direktem physikalischen Kontakt zwischen AFM-Spitze und Probe gemessen werden, also bei Topographie (a) und Adhäsion (b), verläuft der Übergang zwischen Glimmer und DODAB sprunghaft. Stärke und Abklinglänge der elektrostatischen Wechselwirkung sind dagegen Kenngrößen einer Fernwirkung, d. h. sie messen Kräfte, die die AFM-Spitze bereits „spürt“, wenn sie die Probe noch nicht berührt. Bei diesen Größen verläuft der Übergang zwischen Glimmer und DODAB allmählich. Trotzdem ist auch hier der Unterschied zwischen beiden Bereichen deutlich. Die Stärke der Elektrostatik ändert sich innerhalb von 50nm vom Wert, der auf Glimmer gemessen wird, zum Wert auf DODAB. Üblicherweise wird die Halbwertsbreite eines solchen Übergangs - im vorliegenden Fall also 25nm - als Auflösung angegeben. Die Auflösung bei der Messung der charakteristischen elektrostatischen Größen liegt im Bereich der topographischen Auflösung (vergleiche (a) und (c)). Daraus kann man folgern, daß die geometrischen Eigenschaften von Spitze und Probe die Auflösung limitieren. Bessere Auflösungen könnten also z. B. erzielt werden, wenn flache Proben mit strukturierter Oberflächenladung oder schärfere AFM-Spitzen verwendet werden.

4.4 Abhängigkeit vom Elektrolyten

In diesem Abschnitt wird diskutiert, wie die Stärke und die Abklinglänge der elektrostatischen Wechselwirkung von der Konzentration des Elektrolyten und von den Valenzen der Elektrolytionen abhängen. Die Experimente wurden im allgemeinen so durchgeführt, daß die gleiche Probe in zahlreichen verschiedenen Elektrolyten untersucht wurde. Um zu prüfen, ob ein Elektrolyt die Probe irreversibel verändert hatte (z. B. durch Adsorption von Ionen), wurde gelegentlich eine Force Map in einem Referenzelektrolyten aufgenommen (meist LiI oder LiNO_3). Nur wenn die Auswertung dieser Force Map Ergebnisse lieferte, die mit der Referenz vergleichbar waren (was fast immer der Fall war), wurden die unmittelbar davor aufgenommenen Force Maps weiter verwendet.

Kraftkurven, die auf einer Probe mit strukturierter Oberflächenladung aufgenommen werden, bilden zwei Klassen, die die unterschiedlich geladenen Bereiche repräsen-

tieren (vgl. Abbildung 4.3). Das kann man gut veranschaulichen, indem man in einem Diagramm mehrere solcher Kraftkurven übereinander darstellt.

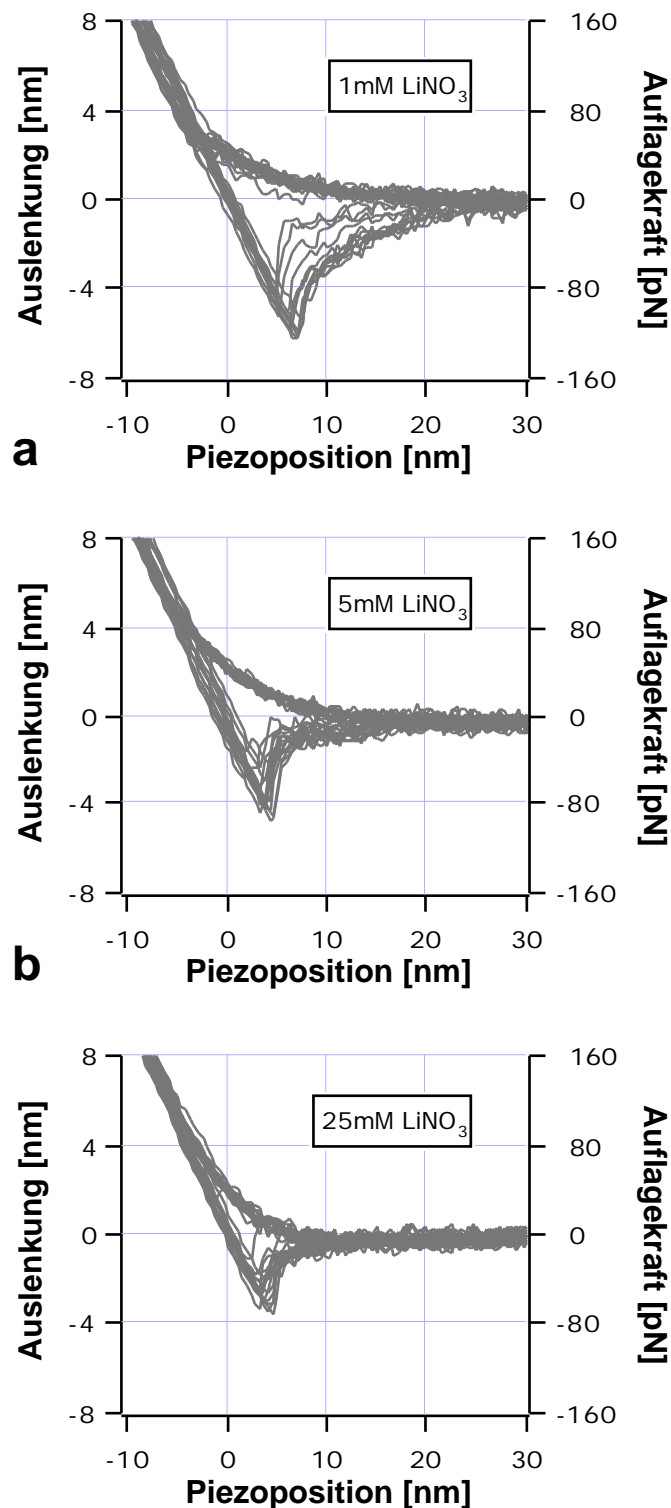


Abbildung 4.8 zeigt jeweils eine Zeile von Kraftkurven. Die Kraftkurven wurden Force Maps entnommen, die auf der gleichen Probe (DODAB-Patch auf Glimmer) in verschiedenen stark konzentrierten LiNO_3 -Lösungen aufgenommen wurden ((a) 1mM, (b) 5mM, (c) 25mM). Wie erwartet nimmt die Abklinglänge der elektrostatischen Wechselwirkung bei zunehmender Salzkonzentration ab. Die mit dem Exponentialfit berechneten Längen (5nm, 2nm und 2nm für die attraktive bzw. 8nm, 7nm und 4nm für die repulsive Wechselwirkung) stimmen nicht mit den Werten überein, die nach der Debye-Hückel-Theorie berechnet wurden (Gleichung (3) in Abschnitt 4.1). Diese Diskrepanz wird in Abschnitt 4.5. diskutiert.

Abbildung 4.9 zeigt Beispiele von Kraftkurven, die in 5mM-Lösungen von Elektrolyten mit bi- und trivalenten Ionen aufgenommen wurden. Die Ionen sammeln sich an der jeweils entgegengesetzt geladenen Oberfläche und schirmen

Abbildung 4.8: Jeweils eine Zeile von Kraftkurven (32 übereinander gedruckte Kurven), entnommen je einer Force Map, die auf der gleichen Probe (DODAB-Patch auf Glimmer) in verschiedenen Konzentrationen von LiNO_3 aufgenommen wurden. Die Kraftkurven bilden jeweils zwei Klassen mit attraktiver bzw. repulsiver Wechselwirkung. Mit steigender Elektrolytkonzentration nimmt die Abklinglänge der elektrostatischen Wechselwirkung ab.

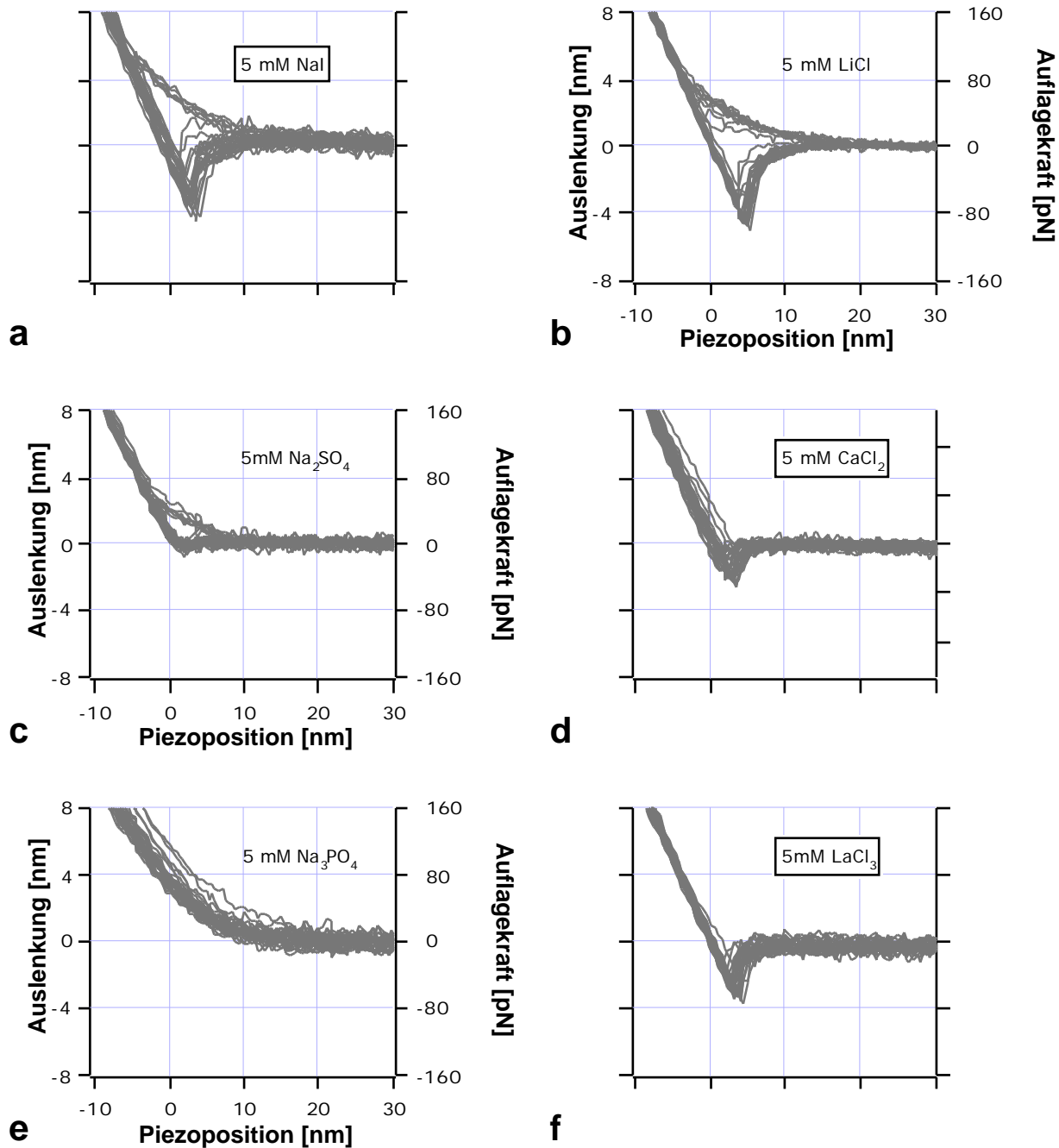


Abbildung 4.9: Jeweils eine Zeile von Kraftkurven (32 übereinander gedruckte Kurven), entnommen je einer Force Map, die auf einem DODAB-Patch auf Glimmer in verschiedenen Elektrolyten (je 5mM) aufgenommen wurde. Bivalente Ionen neutralisieren die Oberflächenladung fast vollständig. Durch trivalente Ionen wird die Ladung überkompensiert, so daß sich das Vorzeichen der elektrostatischen Wechselwirkung umkehrt.

deren Ladung ab. Durch bivalente Anionen wird die elektrostatische Wechselwirkung auf DODAB nahezu vollständig abgeschirmt (c), bivalente Kationen kompensieren die Oberflächenladung von Glimmer (d). Enthält der Elektrolyt trivalente Ionen, wird die Oberflächenladung in beiden Fällen überkompensiert. Analoge Messungen wurden bereits mit dem Surface Force Apparatus durchgeführt [65].

Kraftkurven wie in Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9 wurden in verschiedenen Elektrolytlösungen beobachtet. Bei gleicher Valenz der Ionen der Elektrolyte und gleichen Konzentrationen ergaben sich im Rahmen der Meßungenauigkeit keine Unterschiede zwischen den Salzen (vgl. z. B. Abbildung 4.8b und Abbildung 4.9a und b).

4.5 Debye-Hückel-Theorie

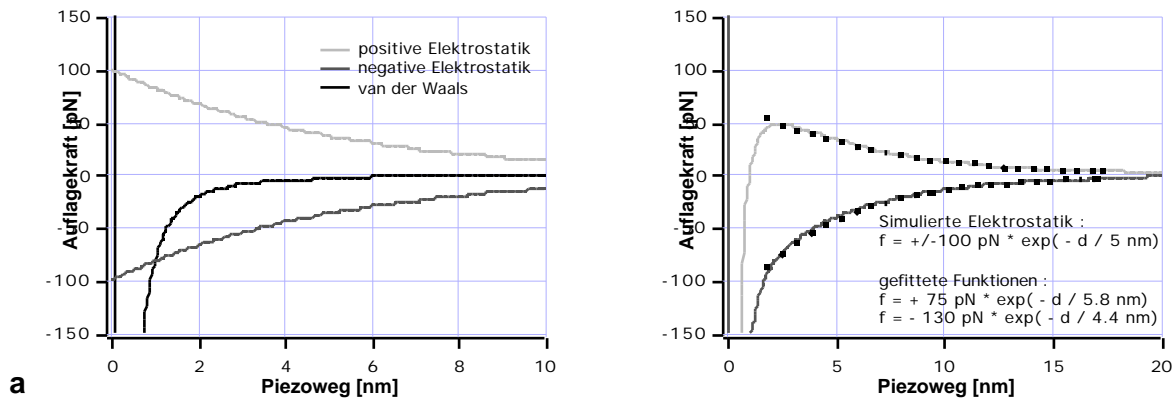
Durch die Messung von Wechselwirkungskräften mit dem AFM kann man eindeutig zwischen positiv und negativ geladenen Oberflächen unterscheiden.

In Abschnitt 4.4 wurde bereits erwähnt, daß die gemessene Abklinglänge der elektrostatischen Wechselwirkung auf positiv und negativ geladenen Oberflächen unterschiedlich ist. Das steht scheinbar im Widerspruch zur Debye-Hückel-Theorie, die gleiche Längen voraussagt (Gleichung (3)) und Werte liefert, die in keinem der beiden Fälle mit den Messungen übereinstimmen. Die Erklärung dafür ergibt sich aus einer einfachen Berechnung der van-der-Waals-Kraft und der elektrostatischen Kraft. Die van-der-Waals-Kraft „bricht die Symmetrie“, d. h. auf Glimmer wird die repulsive Wechselwirkung abgeschwächt, auf DODAB wird die attraktive Wechselwirkung verstärkt. Dadurch erscheinen auch die Abklinglängen der resultierenden Gesamtkräfte unterschiedlich.

Abbildung 4.10 zeigt simulierte Kraft-Abstands-Kurven, bei denen Werte für Stärke und Abklinglänge der elektrostatischen Wechselwirkung gewählt wurden, die im Bereich der gemessenen Werte liegen. Für die van-der-Waals-Wechselwirkung wurden eine kugelförmige Spitze mit 20nm Radius auf flacher Unterlage und eine Hamaker-Konstante von $1,25 \cdot 10^{-20} \text{J}$ angenommen [72]. Durch die Addition der van-der-Waals-Kraft zur attraktiven Elektrostatik einerseits und zur repulsiven Elektrostatik andererseits wird die resultierende Gesamtkraft abgeschätzt. Die Simulation verwendet folgendes Kraftgesetz:

$$F(d) = \frac{H R}{3} \left(\frac{1}{d^2} - \frac{r_0^6}{d^8} \right) + F_0 e^{-\frac{d}{\lambda}} \quad (4)$$

Hier bezeichnen H die Hamaker-Konstante, R den Radius der Kugel, d den Abstand zwischen Kugel und Ebene, r_0 den kleinsten Abstand zwischen den Atomen ($r_0=1\text{\AA}$)



und F_0 die Stärke und λ die Abklinglänge der elektrostatischen Wechselwirkung. F_0 kann positiv oder negativ sein und gibt so Betrag und Richtung der Elektrostatik an. Da hier nur sehr kurzreichweitige Kräfte von Interesse sind, wurden Retardierungseffekte vernachlässigt. Die elektrostatische Wechselwirkung wurde als exponentiell abfallende Kraft angesetzt. Typische Werte für die Stärke und die Abklinglänge wurden aus den gemessenen Kraftkurven bestimmt ($F_0=100\text{pN}$, $\lambda=5\text{nm}$). Ein einfacher Exponentialfit liefert für repulsive Elektrostatik zu lange Abklinglängen und zu geringe Stärken der Wechselwirkung. Bei attraktiver Elektrostatik erscheint die Wechselwirkung zu stark und die Abklinglänge zu kurz. Die Mittelwerte beider Größen scheinen jedoch gute Näherungen für die tatsächlichen Debye-Längen und Debye-Stärken zu sein.

Die Experimente an DODAB-Patches auf Glimmer haben gezeigt, daß das Vorzeichen der elektrostatischen Wechselwirkung problemlos ermittelt werden kann. Eine umfangreichere Simulation ergab, daß für einen großen Bereich der Stärke der Wechselwirkung (40pN-2nN) die berechnete Stärke variiert. Mit dem AFM kann man also darüber hinaus relative Messungen der elektrostatischen Wechselwirkung durchführen oder Veränderungen der Wechselwirkung erkennen.

4.6 Fluktuationen

Die Anzahl von Ionen, die sich zwischen der AFM-Spitze und der Probe befinden und die geladenen Oberflächen abschirmen, ist aufgrund der geringen Größe der Spitze

(Radien 20-40nm) sehr klein. Geht man von typischen Debye-Längen von einigen Nanometern aus und betrachtet einen zylinderförmigen Wirkungsbereich mit Radius 10nm und 10nm Höhe (Volumen $3 \cdot 10^{-24} \text{m}^3$), dann sind bei einer Elektrolytkonzentration von 10mM nur 20 Ionen an der Abschirmung beteiligt. Selbst wenn die Konzentration an der Oberfläche viel größer ist, wird die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe nur von wenigen Ionen beeinflusst. Daraus ergibt sich die Frage, ob Fluktuationen in der Ionenanzahl beobachtet und resultierende zeitliche Schwankungen der elektrostatischen Wechselwirkung gemessen werden können.

Die Zeitskala, auf der solche Fluktuationen stattfinden, kann mit Hilfe der Diffusionsgleichung abgeschätzt werden:

$$t = \frac{(\Delta x)^2}{2 D} \quad (1)$$

Dabei ist Δx der Weg, den ein Partikel in der Zeit t zurücklegt. Typische Werte für die Diffusionskonstante D liegen für Lösungen einfacher anorganischer Salze im Bereich von $10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$ (z. B. $D=9,3 \cdot 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ für NaCl [73]). Daraus ergibt sich eine mittlere Aufenthaltsdauer eines Ions im betrachteten Volumen von 10^{-7}s .

Obwohl das AFM nur im Millisekundenbereich messen kann, werden diese Fluktuationen nicht notwendigerweise „weggemittelt“. Die Analogie zur Brownschen Bewegung zeigt, daß thermische Fluktuationen auch über sehr lange Zeiträume die AFM-Messungen beeinflussen können, wenn die Anzahl der beteiligten Partikel sehr klein ist. Thermische Fluktuationen in der Bewegung der AFM-Spitze bei Kraftmessungen wurden bereits von Cleveland *et al.* analysiert [74].

Das hier verwendete System Glimmer/DODAB-Wasser-Siliziumnitrid ist relativ komplex und Literaturwerte charakteristischer Größen wie z. B. der Hamakerkonstante weichen erheblich voneinander ab. Deshalb wurde auf eine detaillierte Analyse der Fluktuationen verzichtet. Dennoch kann man annehmen, daß Fluktuationen der Ionenanzahl mit dem AFM gemessen werden können.

5. Elastizität von Zellen

Im folgenden Abschnitt werden einige grundlegende AFM-Experimente an lebenden Zellen diskutiert. Technische Hintergründe wie Versuchsaufbau und Auswertung der Daten wurden bereits in Kapitel 3: Material und Methoden besprochen. Hier wird nun zunächst die Frage geklärt, wie sich die Weichheit der Probe auf Abbildungen mit dem AFM auswirkt. Auf diese Weise gelangt man zu einer Modellvorstellung über den Abbildungsvorgang auf weichen Proben. Durch Korrelation von AFM-Daten und Fluoreszenzbildern können in den AFM-Bildern beobachtbare Strukturen als Spannungsfasern identifiziert werden. Die Spannungsfasern stören die Homogenität der Probe und verletzen damit eine der Voraussetzungen, unter denen das Hertz-Modell zur Berechnung der Elastizitätsmoduli verwendet werden darf. Daher muß untersucht werden, wie diese Strukturen die berechneten Elastizitätsmoduli beeinflussen. Abschließend wird anhand zweier Beispiele der Einfluß der Probenelastizität auf die mit dem AFM erreichbare Auflösung diskutiert.

5.1 Einfluß der Probenelastizität auf AFM-Bilder

Beim Abbilden mit dem AFM muß eine endliche Auflagekraft aufgewandt werden, damit die AFM-Spitze in ständigem Kontakt mit der Oberfläche bleibt und der Piezo der Proben topographie folgen kann [13]. Auf weichen Proben, also insbesondere auf lebenden Zellen bewirkt diese Kraft, daß die AFM-Spitze in die Probe eingedrückt wird. Damit können Strukturen, die sich im Inneren der Probe befinden, die AFM-Bilder beeinflussen. Für die Interpretation der Meßergebnisse an lebenden Zellen ist es daher zunächst wichtig, den Abbildungsprozeß auf weichen Proben zu verstehen. Abbildung 5.1 zeigt zwei Beispiele von AFM-Bildern lebender Zellen. Ein Datensatz besteht jeweils aus Höhen- (links) und Auslenkungsbild (rechts), die simultan aufgenommen werden (vgl. Kapitel 3.1.2). Das Höhenbild zeigt abgesehen von kleineren Korrugationen die Topographie der Zelle. Diese Korrugationen, die zu klein sind, um von der Nachregelung des AFM ausgeglichen zu werden, sind im Auslenkungsbild zu sehen. Das Auslenkungsbild kann man sich als gerichtete Ableitung der realen Proben topographie vorstellen. Es vermittelt einen guten Eindruck der Struktur der Probenoberfläche, enthält aber keine absolute Höheninformation.

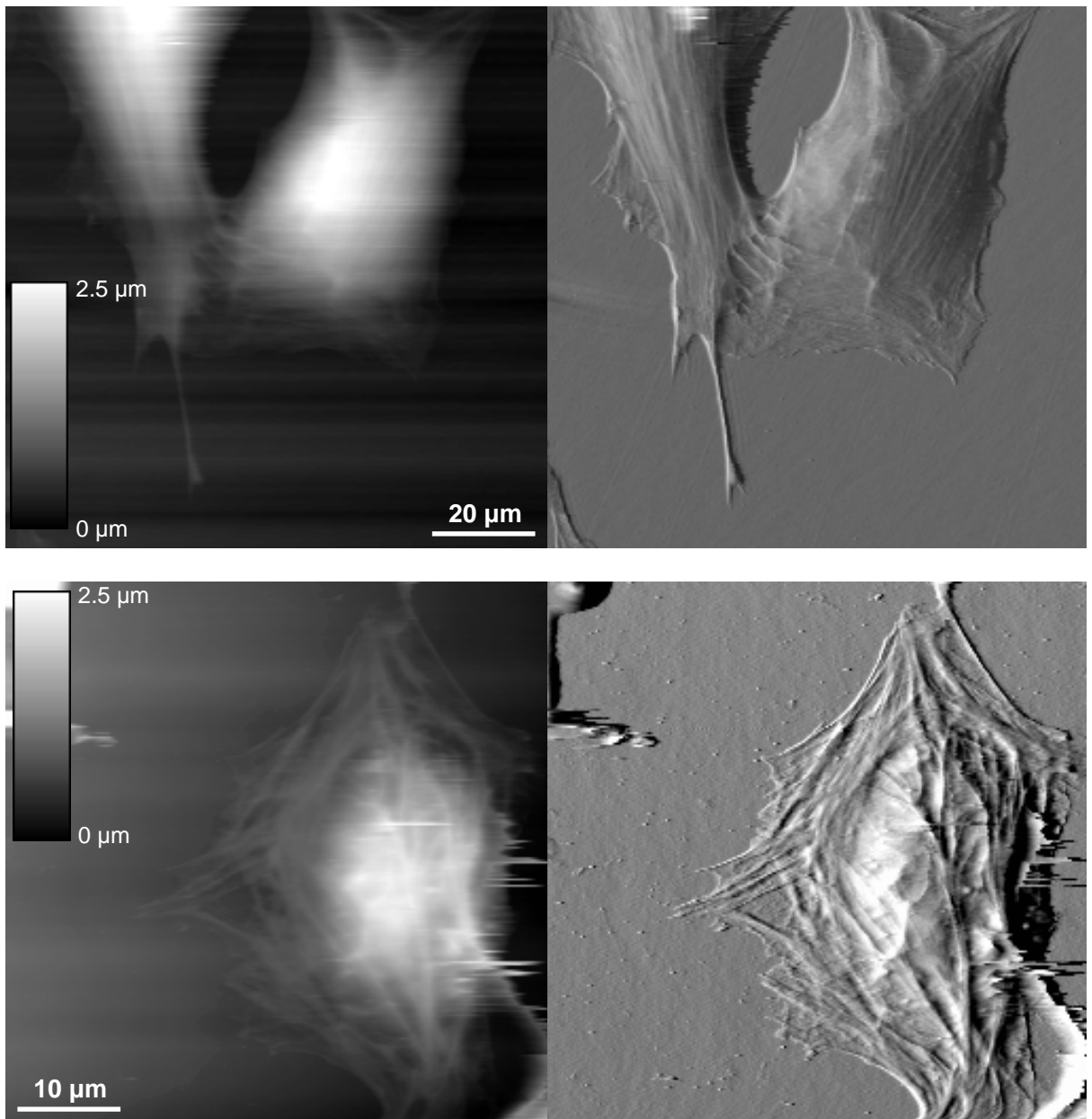


Abbildung 5.1: AFM-Bilder lebender Zellen, aufgenommen im Kontakt-Modus. Links ist jeweils das Höhenbild, rechts das Auslenkungsbild zu sehen. Die obere Figur zeigt zwei 3T3-Fibroblasten, die untere eine Hühnerherzzelle.

Bei den abgebildeten Zellen handelt es sich um 3T3-Fibroblasten (oben) bzw. um eine Hühnerherzzelle, vermutlich ebenfalls ein Fibroblast (unten). Fibroblasten (Bindegewebszellen) sind im Gewebe in eine Kollagenmatrix eingebettet, mit der sie über Fokalkontakte fest verbunden sind. Die Fokalkontakte sind mit den Enden von Spannungsfasern assoziiert (siehe Kapitel 2.2), die in Fibroblasten ein dichtes Netz bilden. In der Zellkultur bilden die Fokalkontakte stabile Verbindungen mit der Petrischale, zwischen denen die Spannungsfasern Zug auf die Zelle ausüben, so daß die Zellen

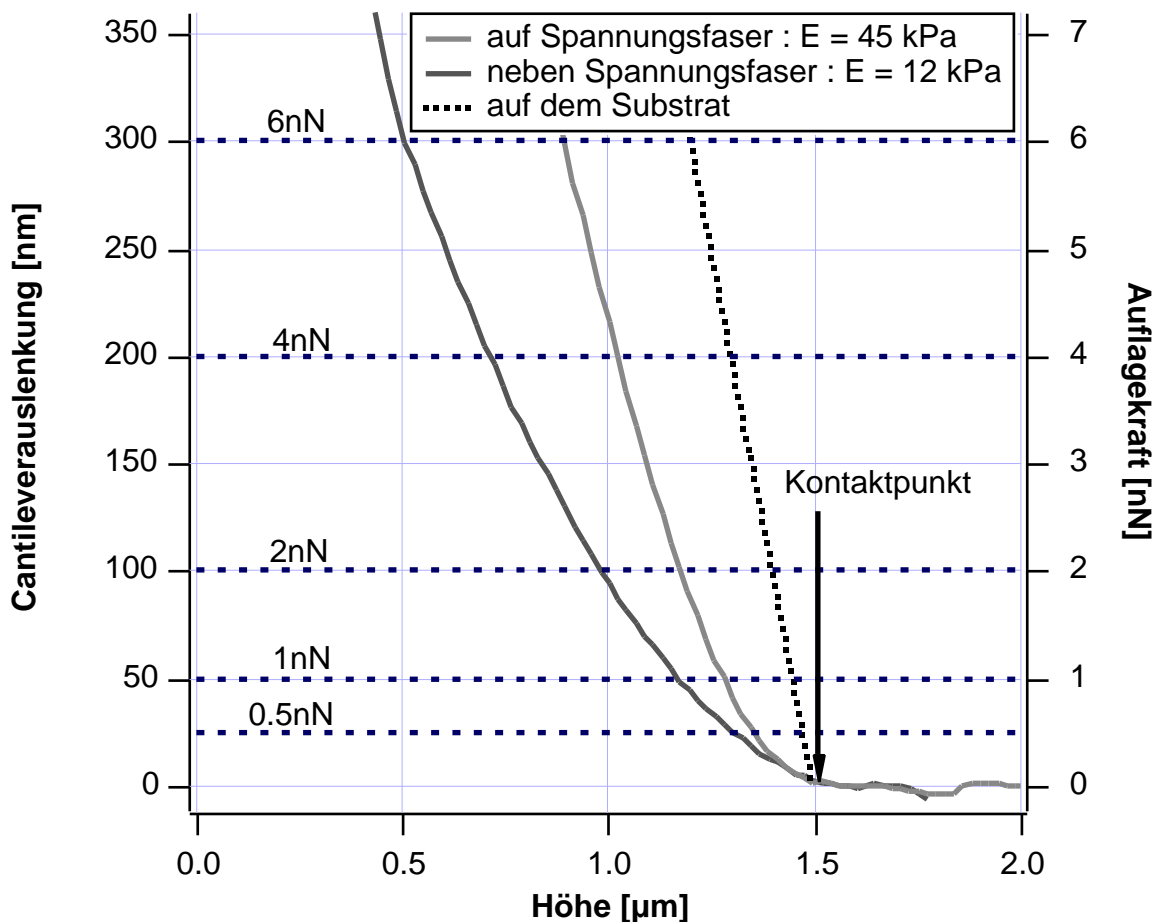


Abbildung 5.2: Kraftkurven auf einer Hühnerherzzelle, einige μm voneinander entfernt aufgenommen. Die unterschiedlichen Anstiege der Kurven deuten auf Unterschiede in der lokalen Elastizität hin. Bei gleichen Auflagenkräften werden unterschiedliche Höhen gemessen (Schnittpunkte der Kraftkurven mit horizontalen Linien konstanter Kraft).

fest adhären und relativ flach bleiben. Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich Fibroblasten gut für Experimente mit dem AFM.

Bei beiden Zelltypen fällt in den AFM-Bildern ein dichtes Netz faseriger Strukturen auf, die quer über die Zellen und entlang konkaver Ränder verlaufen. Aufgrund dieser Morphologie kann angenommen werden, daß es sich dabei um Spannungsfasern handelt. Die Identifikation dieser Strukturen wird im folgenden Abschnitt diskutiert. Hier soll zunächst der Einfluß solcher Strukturen auf den Kontrast in AFM-Bildern untersucht werden.

Die Kontrastentstehung im AFM kann anhand von Kraftkurven veranschaulicht werden. Abbildung 5.2 zeigt zwei Kraftkurven, die auf einer Hühnerherzzelle in geringem Abstand voneinander aufgenommen wurden. Zum Vergleich ist zusätzlich eine theoretische Kraftkurve auf hartem Substrat abgebildet. Aus den Anstiegen der Kurven im Kontaktteil kann man bereits schließen, daß es sich um eine sehr weiche Probe

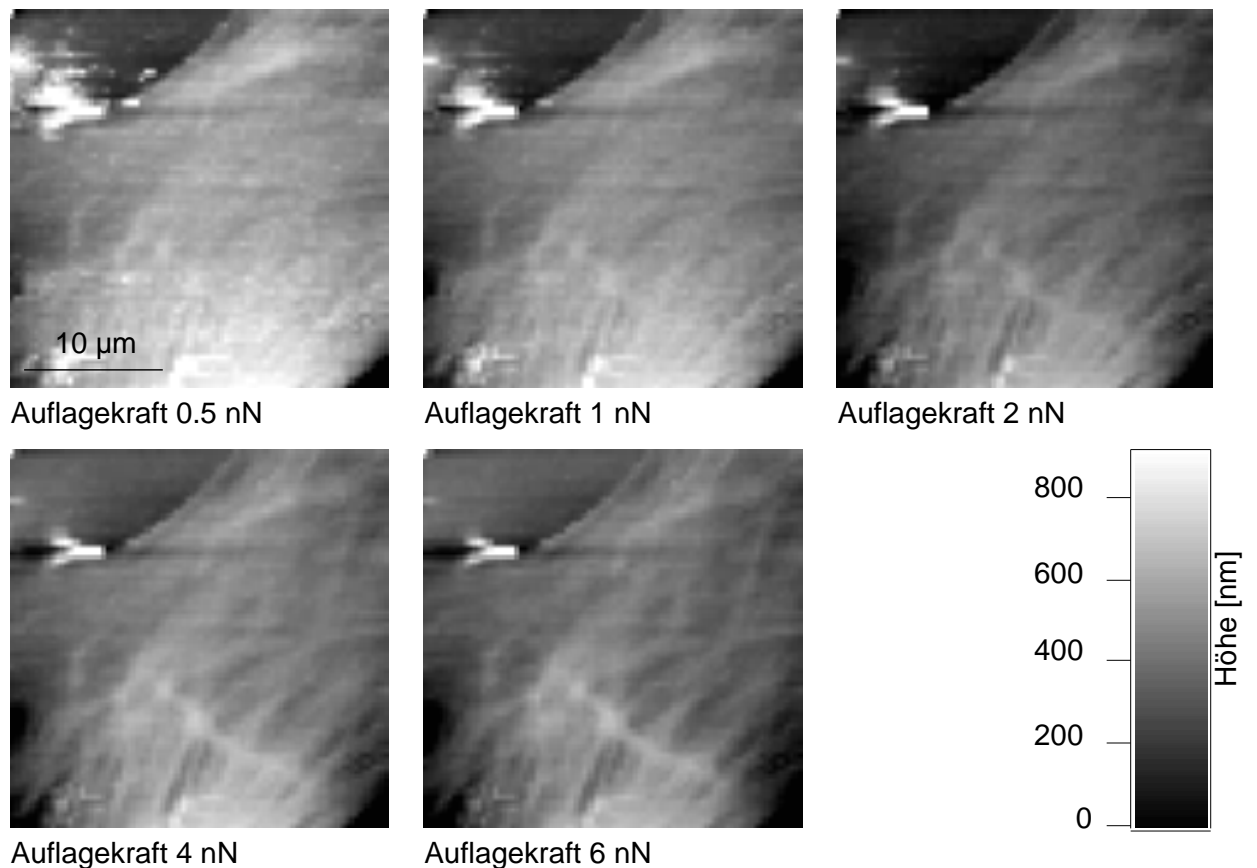


Abbildung 5.3: Topographie der perinuklearen Region einer Hühnerherzzelle ($28 \times 28 \mu\text{m}$) bei verschiedenen Auflagekräften, konstruiert aus den Kraftkurven einer Force Map. Bei hohen Kräften wird die Zelle eingedrückt. Dadurch werden Strukturen innerhalb der Zelle sichtbar (z. B. Spannungsfasern), die lokal die Zellmembran unterstützen.

handelt und daß die Zelle an diesen beiden Stellen unterschiedliche lokale Elastizitätsmoduli aufweist.

Die Kontaktpunkte beider Kurven, die die reale Höhe der Zelle widerspiegeln, liegen etwa bei der gleichen vertikalen Position ($\pm 100 \text{ nm}$ bei $1,5 \mu\text{m}$ Zelldicke). Beim Abbilden im Kontaktmodus mißt das AFM allerdings die Proben topographie bei einer vorgegebenen Auflagekraft. Abhängig von der Auflagekraft können bei gleicher realer Probenhöhe unterschiedliche Höhen gemessen werden. In Abbildung 5.2 kann man die gemessene Höhe jeweils als Schnittpunkt der Kraftkurve mit der entsprechenden Linie konstanter Auflagekraft ablesen. Bei großen Kräften mißt man an den beiden untersuchten Stellen große scheinbare Höhenunterschiede.

Die in Abbildung 5.2 gezeigten Kraftkurven sind einer Force Map entnommen. Indem man die bei einer gegebenen Auflagekraft gemessenen Höhen für alle Kraftkurven der Force Map bestimmt, kann man zweidimensionale Bilder der scheinbaren Proben topographie bei dieser Kraft rekonstruieren. Abbildung 5.3 demonstriert dies für

verschiedene Kräfte zwischen 0,5nN und 6nN. Der Bildausschnitt zeigt die perinukleare Region einer Hühnerherzzelle, die sich von links unten nach rechts oben erstreckt. Links unten befindet sich der Zellkern und in der oberen linken Ecke ist das Substrat zu sehen. Bei niedrigen Auflagekräften sieht die Zelle relativ unstrukturiert aus. Das Bild entspricht dann etwa der realen, ungestörten Topographie der Zelle. Strukturen werden erst bei höheren Kräften sichtbar. Daraus kann man schließen, daß sich diese Strukturen innerhalb der Zelle befinden.

Solche Bilder mit verschiedenen Auflagekräften könnten prinzipiell auch direkt im Kontaktmodus mit dem AFM aufgenommen werden. Aus technischen Gründen ist das mit den gegenwärtig verfügbaren Geräten aber nahezu unmöglich. Im Kontaktmodus wird die Spitze lateral über die Probe gerastert. Sind die Kräfte zu niedrig, kann wie eingangs erläutert kein ständiger Kontakt zwischen AFM-Spitze und Probe aufrechterhalten werden. Beim Abbilden mit hohen Auflagekräften ($>2\text{nN}$ für diesen Zelltyp) würden große seitliche Zugspannungen auf die Zelle ausgeübt werden, die die Zelle im Normalfall zerstören oder vom Substrat lösen. Im Force-Mapping-Modus erfolgt die laterale Bewegung der Spitze, wenn sich diese nicht in Kontakt mit der Probe befindet. Dadurch ist Force Mapping auch bei deutlich höheren Kräften ($>7\text{nN}$, siehe Abbildung 5.2) wesentlich schonender für die Zellen als konventionelles Abbilden. Schlecht adhärierende Zellen wie der Schleimpilz *Dictyostelium Discoideum* oder Keratocyten aus der Fisch-Epidermis können beispielsweise nur im Force-Mapping-Modus mit dem AFM untersucht werden (siehe Kapitel 7.2). Während man sich also beim Abbilden mit dem AFM auf ein relativ kleines Kraftfenster beschränken muß, können aus Force Maps Höhenbilder für einen großen Kraftbereich konstruiert werden (einschließlich des realen Höhenbilds bei Auflagekraft null).

Ein weiterer Vorteil der Höhenmessung mit Hilfe von Force Maps ist, daß für jeden Bildpunkt, d. h. in jeder einzelnen Kraftkurve individuell die Auflagekraft bestimmt wird, so daß tatsächlich Bilder mit konstanter Kraft konstruiert werden können. Das ist im Kontaktmodus oft nicht möglich, denn die Kraft driftet hier i. a. beträchtlich innerhalb eines Datensatzes. Es handelt sich dabei um eine thermische Drift des Cantilevers [75], dessen Aufbau (Goldbedampfung auf SiN_3) einem Bimetallthermometer ähnelt.

Nachdem gezeigt wurde, daß in AFM-Bildern weicher Proben Strukturen innerhalb der Probe sichtbar werden, und angenommen werden kann, daß es sich dabei um

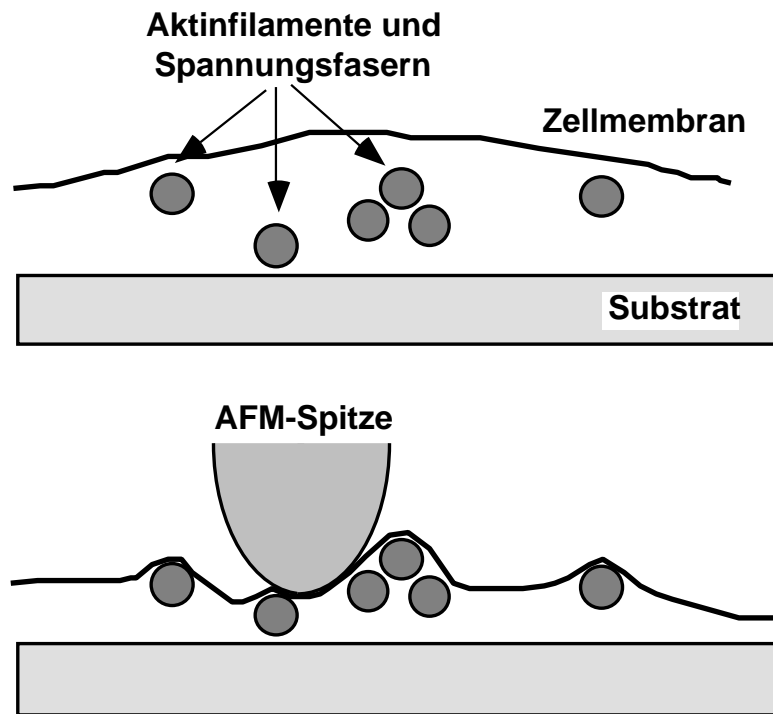


Abbildung 5.4: Vereinfachtes Modell der Bildentstehung beim Abbilden lebender Zellen mit dem AFM. Das Zytoskelett, insbesondere Aktinfilamente und Spannungsfasern bringen der Auflagekraft Widerstand entgegen. Weiche Teile der Zelle wie z. B. die Glykokalix oder nicht von Spannungsfasern unterstützte Regionen der Membran werden stark komprimiert. Die Auslenkung des Cantilevers, also die gemessene Höhe wird von Topographie und mechanischen Eigenschaften der Probe beeinflusst.

Bestandteile des Zytoskeletts handelt (Nachweis im folgenden Kapitel), gelangt man zu einer Modellvorstellung über den Abbildungsvorgang des AFM an lebenden Zellen, wie sie in Abbildung 5.4 schematisch dargestellt ist. Weiche Regionen der Zelle werden von der AFM-Spitze stark komprimiert und erscheinen sehr flach, während von Spannungsfasern oder anderen stabilen Strukturen unterstützte Regionen nur wenig komprimiert werden. Man erhält ein Bild, in dem der Höheninformation ein von der Auflagekraft abhängiger Elastizitätskontrast überlagert ist.

Dieses Modell des Abbildungsvorgangs wurde bereits im Zusammenhang mit den ersten AFM-Experimenten an lebenden Zellen von Henderson *et al.* entwickelt [21]. Alternativ wurde vorgeschlagen, daß zytoskelettale Strukturen sichtbar werden, indem die Spitze die Zellmembran durchdringt und diese Strukturen direkt abbildet. Haydon und Parpura konnten durch Nachweis in die Zelle eingebrachter Farbstoffe im Medium nach dem AFM-Experiment zeigen, daß das bei Verwendung geschärfter AFM-Spitzen bei großen Kräften tatsächlich der Fall sein kann, daß aber die hier verwendeten Spitzen die Membran intakt lassen [76].

5.2 Identifikation zellulärer Strukturen

In AFM-Bildern fest an die Petrischale adhärierter Zellen wie Hühnerherzzellen, Fibroblasten (siehe Abbildung 5.1) oder Glia-Zellen [21] fallen ausgeprägte faserige Strukturen auf. Solche Strukturen wurden bei schnell kriechenden Zellen wie Keratocyten (Kapitel 7.2) oder Kupfferzellen (Kapitel 5.4 und 6.2) nicht beobachtet. Bisher wurde zwar davon ausgegangen, daß es sich dabei um Spannungsfasern handelt (siehe Kapitel 2.2 und 5.1), aber das wurde noch nicht zweifelsfrei bewiesen.

Abbildung 5.5a zeigt ein AFM-Auslenkungsbild eines lebenden NRK-Fibroblasten (die untere Bildhälfte erscheint aufgrund der sehr geringen Auflagekraft nahezu unstrukturiert). Die kabelartigen Strukturen, die größtenteils parallel zur Längsachse der Zelle verlaufen, kann man bei höherer Vergrößerung gut erkennen (Pfeil in Abbildung 5.5b). Die Oberfläche der Zelle erscheint deutlich glatter im realen Höhenbild (Abbildung 5.5c), das die Probenoberfläche bei Auflagekraft null zeigt und unter

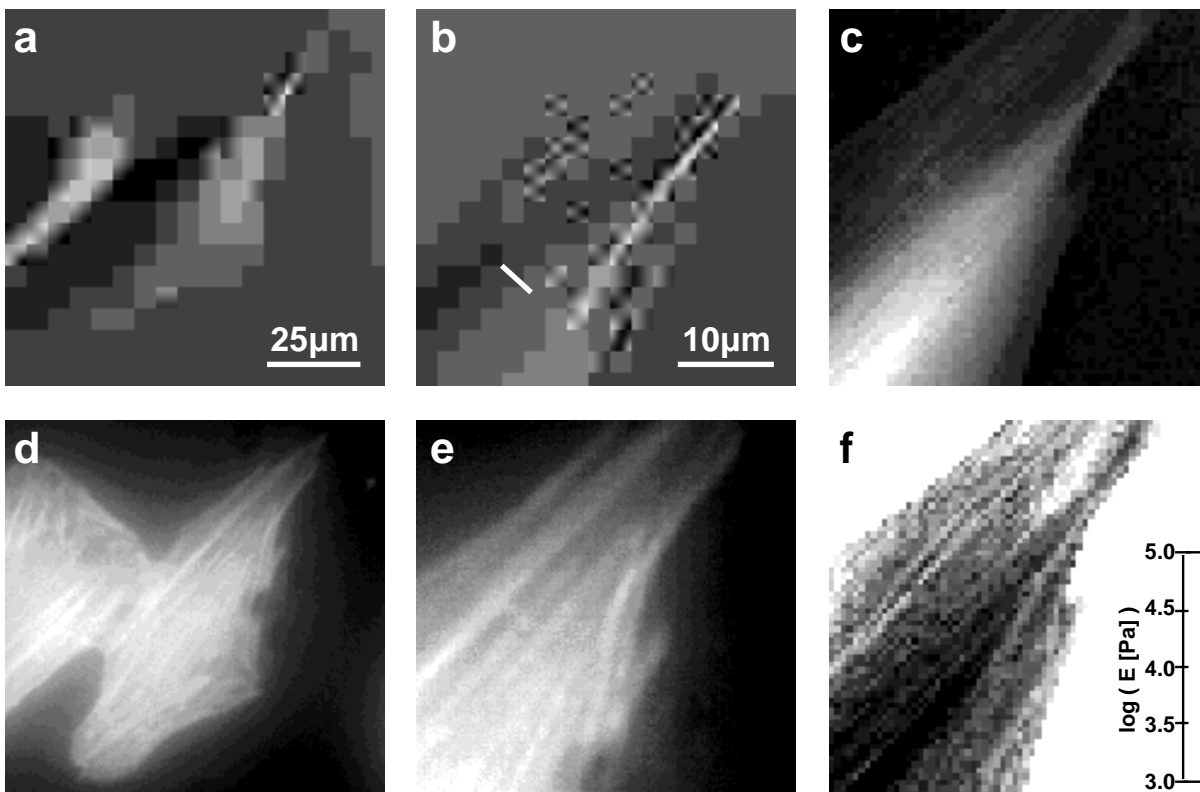


Abbildung 5.5: Durch Korrelation von AFM-, Elastizitäts- und Fluoreszenzbildern können faserige Strukturen in den AFM-Daten als Spannungsfasern identifiziert werden. (a) Auslenkungsbild eines NRK-Fibroblasten. (b) Vergrößerung. Der Pfeil zeigt eine der beobachteten Fasern. (c) Reales Höhenbild (Auflagekraft null), aus einer Force Map der gleichen Region berechnet. Fasern sind nicht zu sehen. Das zeigt, daß sich diese unterhalb der Membran befinden. (d,e) Fluoreszenzbilder der in (a) und (b) gezeigten Regionen. Hier wurde das Aktinnetzwerk nach dem AFM-Experiment mit Rhodamin-Phalloidin markiert. (f) Elastizitätsbild, berechnet aus der bereits in (c) verwendeten Force Map. Auf den Fasern sind die Elastizitätsmoduli größer als in der Umgebung.

Anwendung des Hertz-Modells aus einer Force Map der in Abbildung 5.5b gezeigten Region konstruiert wurde. Aus dem Vergleich dieser Bilder kann man wieder schließen, daß sich die Fasern unterhalb der Zellmembran befinden. Das zugehörige Elastizitätsbild ist in Abbildung 5.5f zu sehen. Die berechneten Elastizitätsmoduli sind als Grautöne codiert: dunkle Gebiete sind sehr weich, hellere Regionen wie z. B. der Boden der Petrischale in der oberen linken Ecke und am rechten Rand sind härter. Die faserigen Strukturen erscheinen hier als Gebiete mit erhöhtem Elastizitätsmodul.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den faserigen Strukturen tatsächlich um Spannungsfasern handelt, wurde das Aktinnetzwerk der Zelle direkt nach dem AFM-Experiment mit Rhodamin-Phalloidin markiert. *Phalloidin* bindet spezifisch an filamentäres Aktin und stabilisiert dabei das Filament, indem es die Dissoziation von Monomeren verhindert [77,78]. Diese Spezifität wird auch für die Fluoreszenzmarkierung des Aktinnetzwerks ausgenutzt. Hier vermittelt Phalloidin die Bindung zwischen dem Farbstoff Rhodamin und den Aktinfilamenten.

Die resultierenden Fluoreszenzbilder der untersuchten Regionen sind in Abbildung 5.5d und Abbildung 5.5e dargestellt. Die starke Fluoreszenz des Hintergrunds kann durch Bindung des Farbstoffs an kurze Aktin-Oligomere erklärt werden. Zwischen den AFM-Bildern (Abbildung 5.5a und b), dem Elastizitätsbild (Abbildung 5.5c) und den Fluoreszenzbildern (Abbildung 5.5d und e) beobachtet man eine starke Korrelation. Damit ist gezeigt, daß die faserigen Strukturen in den AFM-Bildern Spannungsfasern sind.

5.3 Spannungsfasern und Zellelastizität

Nachdem die in den AFM-Bildern beobachteten Strukturen als Spannungsfasern identifiziert wurden, soll nun deren Einfluß auf die Elastizitätsmessungen diskutiert werden. Dazu wurde die bereits in Abbildung 5.2 und Abbildung 5.3 verwendete Force Map einer Hühnerherzzelle mit Hilfe des in Kapitel 3.3.4 beschriebenen Algorithmus ausgewertet. Abbildung 5.6 zeigt das resultierende Elastizitätsbild.

Die Spannungsfasern, die bereits in den topographischen Bildern bei konstanter Kraft zu sehen waren (Abbildung 5.3), erscheinen hier als Regionen mit scheinbar höherem Elastizitätsmodul von etwa 30-50kPa. Auf den umgebenden weicherer Teilen der Zelle werden Young-Moduli von 1-20kPa gemessen.

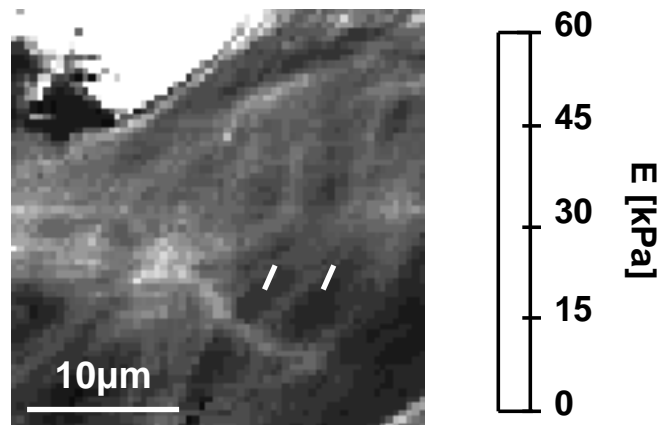


Abbildung 5.6: Elastizitätsbild einer Hühnerherzzelle, berechnet aus der gleichen Force Map, die für die Topographien bei konstanter Kraft in Abbildung 5.3 verwendet wurde. Auf Spannungsfasern sind die Elastizitätsmoduli höher als in der Umgebung. Die Pfeile geben die Positionen an, bei denen die in Abbildung 5.2 gezeigten Kraftkurven aufgenommen wurden.

Die Pfeile in Abbildung 5.6 zeigen die Stellen, an denen die Kraftkurven in Abbildung 5.2 aufgenommen wurden. Die bereits angesprochenen deutlichen Unterschiede im Kurvenverlauf und die resultierenden Elastizitätsunterschiede kommen dadurch zustande, daß eine der Kurven auf einer Spannungsfaser aufgenommen wurde, die andere aber auf einer unmittelbar daneben liegenden weicheren Region.

Das Hertz-Modell (Gleichung (3) in Kapitel 3.3.2) sagt einen quadratischen Zusammenhang zwischen der Auflagekraft der AFM-Spitze F und ihrer Eindrückung in die

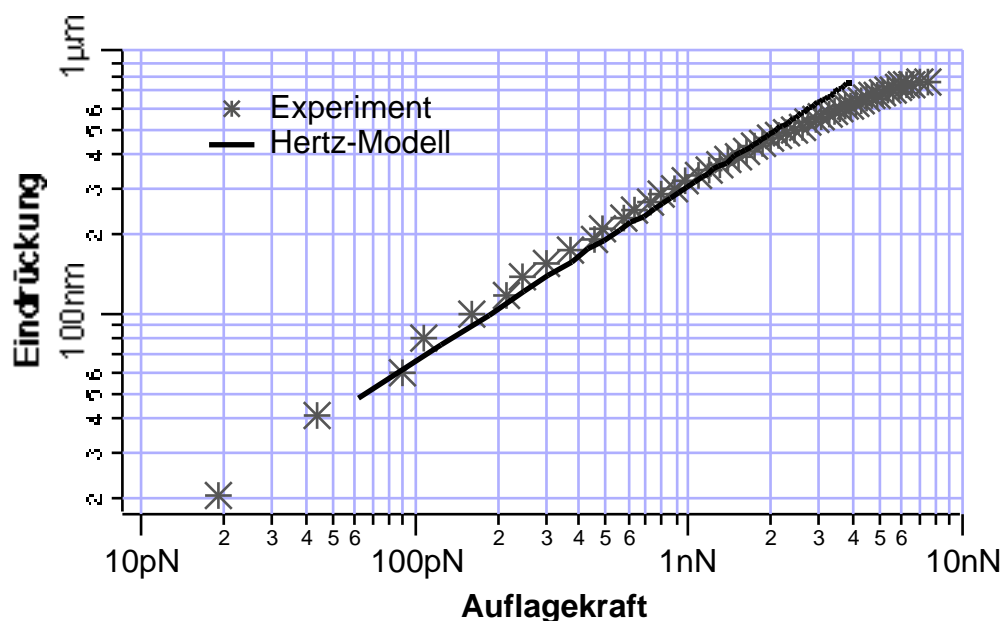


Abbildung 5.7: Auswertung der flacheren Kraftkurve aus Abbildung 5.2 nach dem Hertz-Modell. Gemäß Gleichung (3) in Kapitel 3.3.2 hängen Auflagekraft und Eindrückung quadratisch zusammen. Für $E=12\text{kPa}$ ergibt sich die gezeigte Gerade in doppelt-logarithmischer Darstellung, die die experimentellen Daten im Bereich geringer Eindrückungen gut beschreibt.

Probe voraus. Ob ein solcher Zusammenhang zweier gemessener Größen über ein einfaches Potenzgesetz tatsächlich gegeben ist, kann graphisch überprüft werden, indem diese Größen in einem doppelt-logarithmischen Diagramm gegeneinander aufgetragen werden.

Für die flachere Kraftkurve aus Abbildung 5.2, die auf einer weichen Region der Zelle aufgenommen wurde, ergibt sich der in Abbildung 5.7 gezeigte Graph. Für kleine Eindrückungswerte liegen die Punkte erwartungsgemäß auf einer Geraden, deren Anstieg von 0,5 den quadratischen Zusammenhang bestätigt und aus deren Lage durch den gezeigten Fit ein Elastizitätsmodul von 12kPa bestimmt wird. Die Abweichungen bei großen Eindrückungen sind auf die Spitzengeometrie zurückzuführen. Nach 200nm ändert sich der Öffnungswinkel der pyramidenförmigen Spitze von 18° auf 35° (vgl. Abbildung 3.5), so daß im Vergleich zur Modellspitze (18° über die gesamte Länge) aufgrund der stärker wachsenden Kontaktfläche zwischen Spitze und Probe größere Kräfte nötig sind, um gleiche Eindrückungen zu erzielen.

Im Fall der steileren Kraftkurve aus Abbildung 5.2, die auf einer Spannungsfaser aufgenommen wurde, versagt das Hertz-Modell. Abbildung 5.8 zeigt, daß die Punkte nicht auf der vom Modell vorausgesagten Geraden liegen, daß also Auflagekräfte und Eindrückungen nicht quadratisch zusammenhängen.

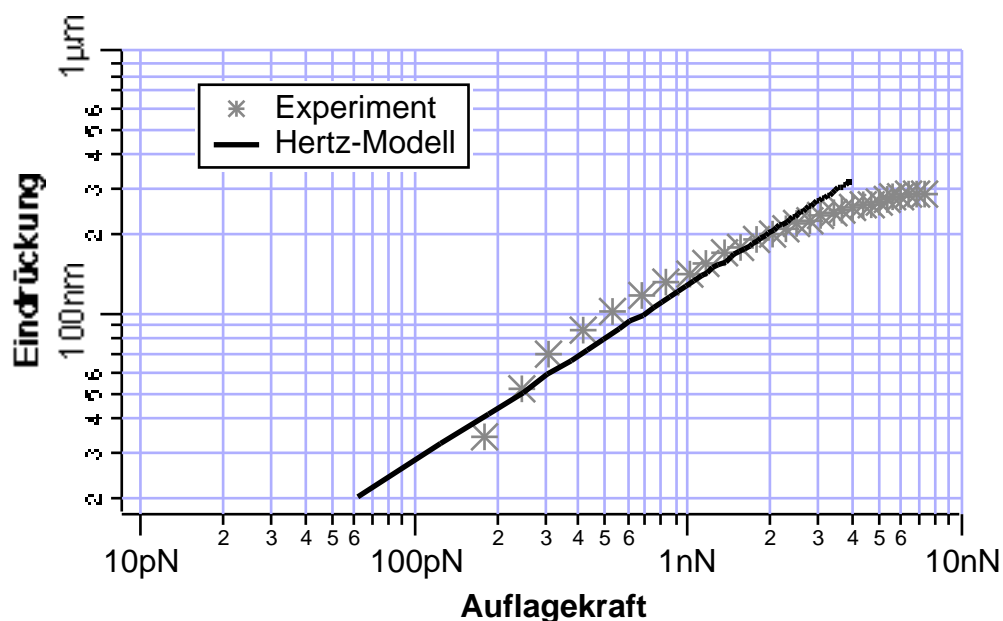


Abbildung 5.8: Auswertung der steileren Kraftkurve aus Abbildung 5.2 nach dem Hertz-Modell. Hier erfüllen die experimentellen Daten den vom Modell vorausgesagten quadratischen Zusammenhang zwischen Auflagekraft und Eindrückung nicht. Der beste Fit ergab sich mit der gezeigten theoretischen Kurve für $E=45\text{kPa}$.

Durch die Spannungsfaser wird das weiche Zytosol lokal mechanisch stabilisiert. Diese Regionen erscheinen härter als die Umgebung, allerdings weicht der Verlauf der Kraftkurven stark vom Hertz-Modell ab. Der durch den Fit berechnete Wert des Elastizitätsmoduls an dieser Stelle der Zelle ist daher nicht zuverlässig. Das Versagen des Hertz-Modells ist darauf zurückzuführen, daß eine der Voraussetzungen des Modells - die Homogenität der Probe - nicht erfüllt ist.

Aus dem Versagen des Modells kann allerdings, z. B. durch eine Analyse der Standardabweichung zwischen gemessener und theoretischer Kraftkurve auf Inhomogenitäten der Probe rückgeschlossen werden. So können Regionen der Zelle identifiziert werden, in denen die berechneten Elastizitätsmoduli z. B. aufgrund des Einflusses von Spannungsfasern oder wegen zu geringer Zelldicke nicht zuverlässig sind.

Auf den Spannungsfasern wurden lokale Young-Moduli gemessen, die etwa drei bis zehnmal größer sind als Werte in der direkten Umgebung. Die konkreten Zahlen sollten zwar mit Vorsicht interpretiert werden, stimmen aber dennoch gut mit dem von Satcher und Dewy theoretisch vorhergesagten Elastizitätsverhältnis überein [79].

5.4 Auflösungsvermögen des AFM auf lebenden Zellen

Auf harten anorganischen Proben kann mit dem AFM atomare Auflösung erreicht werden [4,5]. Auch auf geeigneten biologischen Proben sind Auflösungen im Sub-Nanometer-Bereich möglich [12,80,81]. In AFM-Bildern lebender Zellen gehören dagegen einzelne Spannungsfasern, deren Durchmesser etwa 25nm betragen, zu den kleinsten auflösbaren Strukturen. Die Ursache für diese Verschlechterung der Abbildungseigenschaften wird im folgenden anhand zweier Beispiele diskutiert .

Im ersten Fall wurde versucht, dynamische Umstrukturierungen im Zytoskelett von Leberendothelzellen (LEC) mit dem AFM im Zeitverlauf zu untersuchen. LEC sind hochgradig spezialisierte Zellen, die in der Leber die Funktion eines mechanischen Siebs übernehmen [82]. In den Lamellipodien von LEC befinden sich feine Poren, sogenannte Fenestrae, die Durchmesser von etwa 200nm haben und von einem aktinhaltigen Zytoskelettring umgeben sind, der sie stabilisiert und die Porengröße reguliert [83]. Die Fenestrae sind dicht gepackt in größeren kreisförmigen oder ovalen Regionen, den sogenannten Siebplatten angeordnet. Die Zugabe von Wirkstoffen wie Cytochalasin B oder Latrunculin A, die das Aktinnetzwerk angreifen, bewirkt einen schnellen und deutlichen Anstieg in der Fenestrae-Zahl [84].

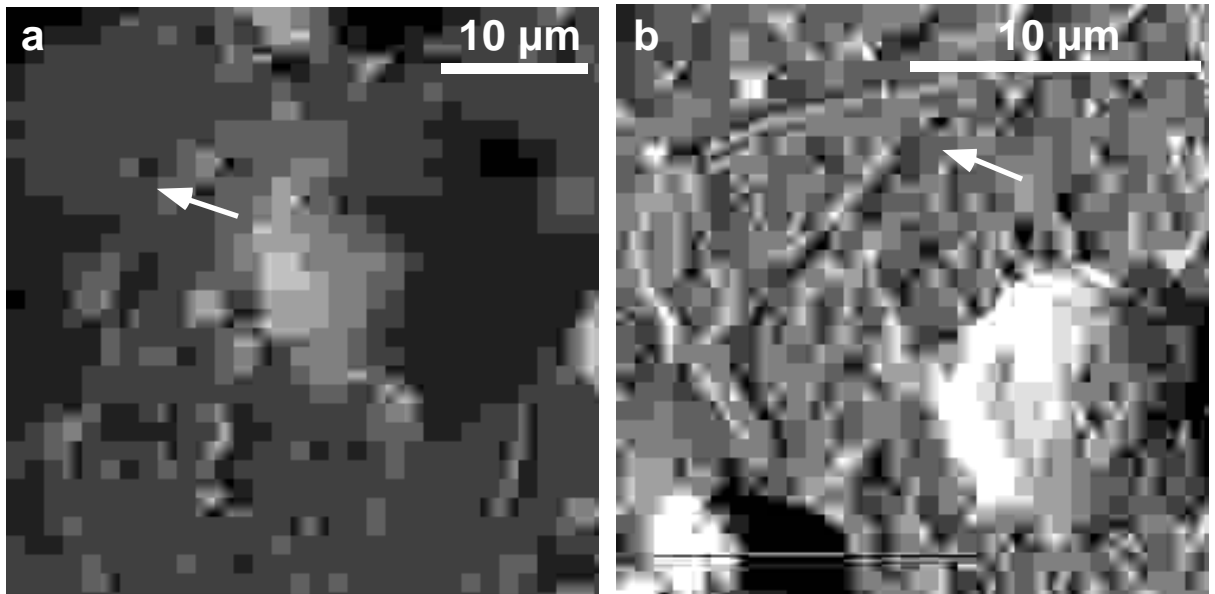


Abbildung 5.9: AFM-Bilder lebender (a) und fixierter (b) Leberendothelzellen (LEC). Auf lebenden LEC ist die Auflösung schlecht. Siebplatten sind evtl. erkennbar (Pfeil in (a)), einzelne Fenestrae werden nicht aufgelöst. Nach der Fixierung sieht man die Siebplatten deutlich. Die Vertiefungen darin sind die Fenestrae (Pfeil in (b)).

Abbildung 5.9 zeigt AFM-Bilder von lebenden (a) bzw. mit 1% Glutaraldehyd fixierten (b) LEC. Die *Fixierung* mit Aldehyden ist ein Prozeß, dessen zugrundeliegende Chemie noch nicht vollständig verstanden wurde [85,86]. Es ist bekannt, daß Aldehyde kovalent an die Aminogruppen (NH_2) von Proteinen binden. Glutaraldehyd enthält zwei Aldehydgruppen, kann deshalb Proteine quervernetzen und z. B. Zellen dadurch mechanisch stabilisieren. Bei der Fixierung lebender Zellen mit Glutaraldehyd werden Oberflächenstrukturen nahezu vollständig erhalten [87].

Ein Vergleich der Bilder in Abbildung 5.9 zeigt, daß die Auflösung, die mit dem AFM erreicht werden kann, nach der Fixierung deutlich besser ist. Auf der fixierten Zelle sind die Siebplatten gut zu erkennen. Die darin enthaltenen Vertiefungen sind die Fenestrae (Pfeil in Abbildung 5.9b). Im Bild der lebenden Zelle konnten Fenestrae nicht aufgelöst werden. Siebplatten sind aber evtl. noch zu erkennen (Pfeil in Abbildung 5.9a). Man kann daraus schlußfolgern, daß die erreichte Auflösung auf den lebenden LEC schlechter als der typische Durchmesser der Fenestrae (200nm), auf den fixierten Zellen dagegen besser als diese Größe ist. Durch Abbilden der gleichen Zelle vor und nach der Fixierung konnte gezeigt werden, daß tatsächlich Fenestrae in der lebenden Zelle vorhanden waren und daß diese durch den Abbildungsprozeß nicht zerstört wurden.

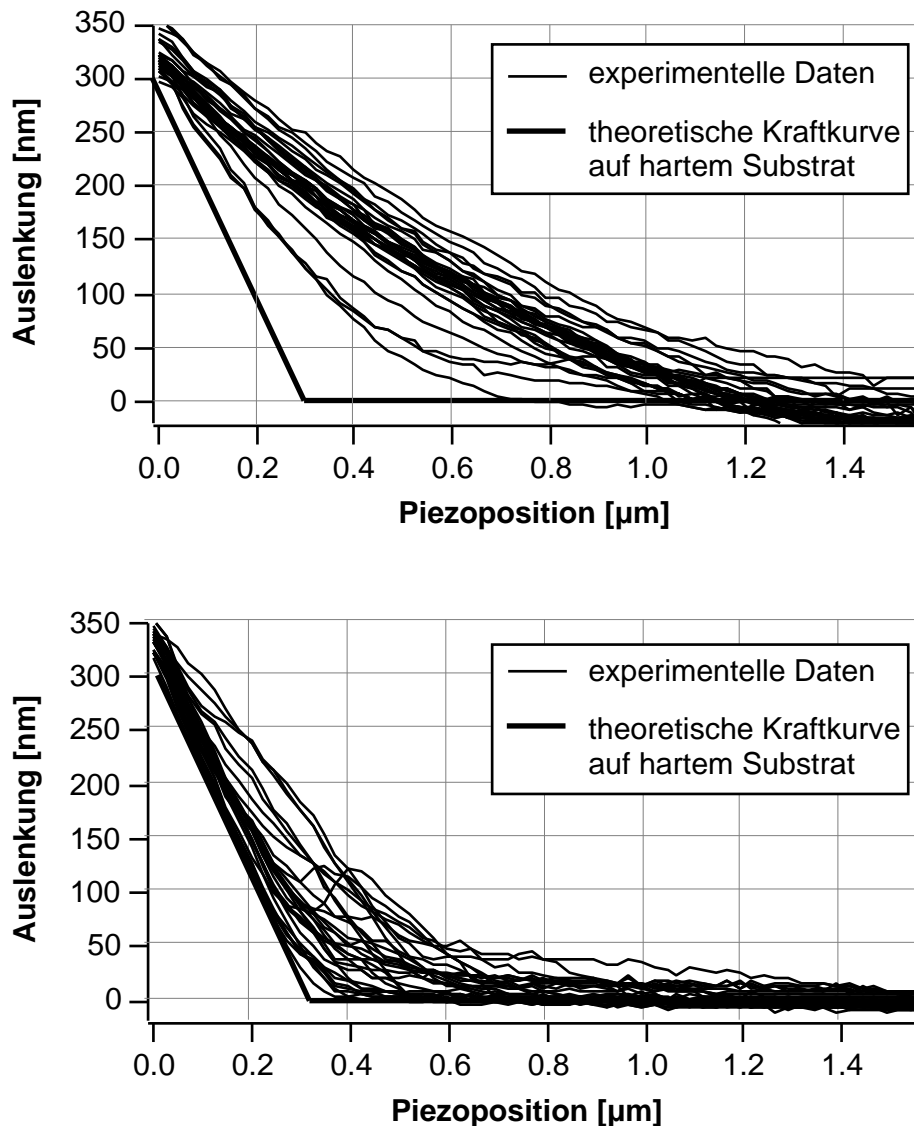


Abbildung 5.10: Kraftkurven auf lebender (oben) und fixierter (unten) LEC. Alle Kraftkurven aus jeweils einer Zeile einer Force Map wurden übereinander gedruckt, um den mittleren Verlauf zu verdeutlichen. Zum Vergleich sind theoretische Kurven auf harter Unterlage dargestellt. Die flachen Kraftkurven auf der lebenden Zelle zeigen bereits die Weichheit der Probe. Auf der fixierten Zelle ist der Kurvenverlauf vergleichbar mit der theoretischen Kurve, allerdings treten Abweichungen bei kleinen Auslenkungen auf.

Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften lebender und fixierter Zellen werden schon in den Kraftkurven deutlich, die auf diesen Zellen aufgenommen wurden. Abbildung 5.10 zeigt je eine Zeile von Kraftkurven aus einer Force Map im Vergleich mit dem theoretischen Kurvenverlauf auf harter Unterlage. Die Kurven, die auf der lebenden Zelle aufgenommen wurden, verlaufen wesentlich flacher, als die theoretische Kurve (oberer Graph). Bei der fixierten Zelle (unterer Graph) sind die Anstiege der theoretischen und experimentellen Kurven dagegen vergleichbar, die Zelle ist also steifer geworden. Eine Auswertung der Kraftkurven nach dem Hertz-Modell

(Kapitel 3.3.4) zeigt, daß der mittlere Elastizitätsmodul der Zelle durch die Fixierung um mehr als zwei Größenordnungen von etwa 1kPa auf über 100kPa zugenommen hat.

In einem zweiten Experiment wurden die Abbildungseigenschaften von AFM und Rasterelektronenmikroskop (Scanning Electron Microscope, SEM) am Beispiel der Kupfferzellen verglichen. Kupfferzellen sind Makrophagen, die in den Nebennieren das vom Darm kommende Blut untersuchen, um Fremdkörper aufzuspüren und unschädlich zu machen [88]. Sie sind an der Beseitigung von Endotoxinen aus dem Blut beteiligt und spielen damit eine wichtige Rolle im Immunsystem und bei der Tumoralabwehr [82]. Ihr Aktinnetzwerk ist sehr ausgeprägt und reguliert Form und Beweglichkeit der Zelle sowie den intrazellulären Transport [89]. Kupfferzellen besitzen für Makrophagen typische strukturelle Merkmale, z. B. ein geringes Verhältnis zwischen Kern- und Zytoplasmavolumen, Pseudopodien und zahlreiche Lysosomen und Mikrovilli [90].

Zwei Stunden nach der Präparation sind Kupfferzellen meist schon sehr flach und adhären fest am Boden der Petrischale. Für die SEM-Aufnahmen müssen die Zellen dann fixiert, dehydriert, silanisiert und mit Gold beschichtet werden [91]. Abbildung 5.11a zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kupfferzelle. Der Zellkörper ist unregelmäßig geformt, in der Mitte befindet sich der erhöhte Kernbereich und flache Lamellipodien zeigen, daß die Zelle bereits gut adhäriert. Besonders bei höherer Auflösung wie in Abbildung 5.11b kann man deutlich zahlreiche wurmförmige Ausstülpungen auf der Membran erkennen. Dabei handelt es sich um Mikrovilli, etwa 1µm lange und 0,08µm breite Membranfortsätze, die der Vergrößerung der Absorptionsfläche der Zelle dienen. Jeder einzelne Mikrovillus beinhaltet ein starres Bündel aus 20-30 parallelen Aktinfilamenten.

Ein AFM-Bild einer Kupfferzelle, das bereits 30min nach dem Aussäen aufgenommen wurde, ist in Abbildung 5.11c zu sehen. Verschiedene Regionen der Zelle wie Kern und Lamellipodien können deutlich unterschieden werden. Der geringe Durchmesser der Zelle und die symmetrische Form der Lamellipodien lassen vermuten, daß sich die Zelle noch nicht vollständig ausgebreitet hat. Ein Vergleich der simultan aufgenommenen Auslenkungsbilder in entgegengesetzten Rasterrichtungen (hier wurde nur eins der Bilder ausgewählt) zeigt aber, daß die Zelle bereits fest mit der

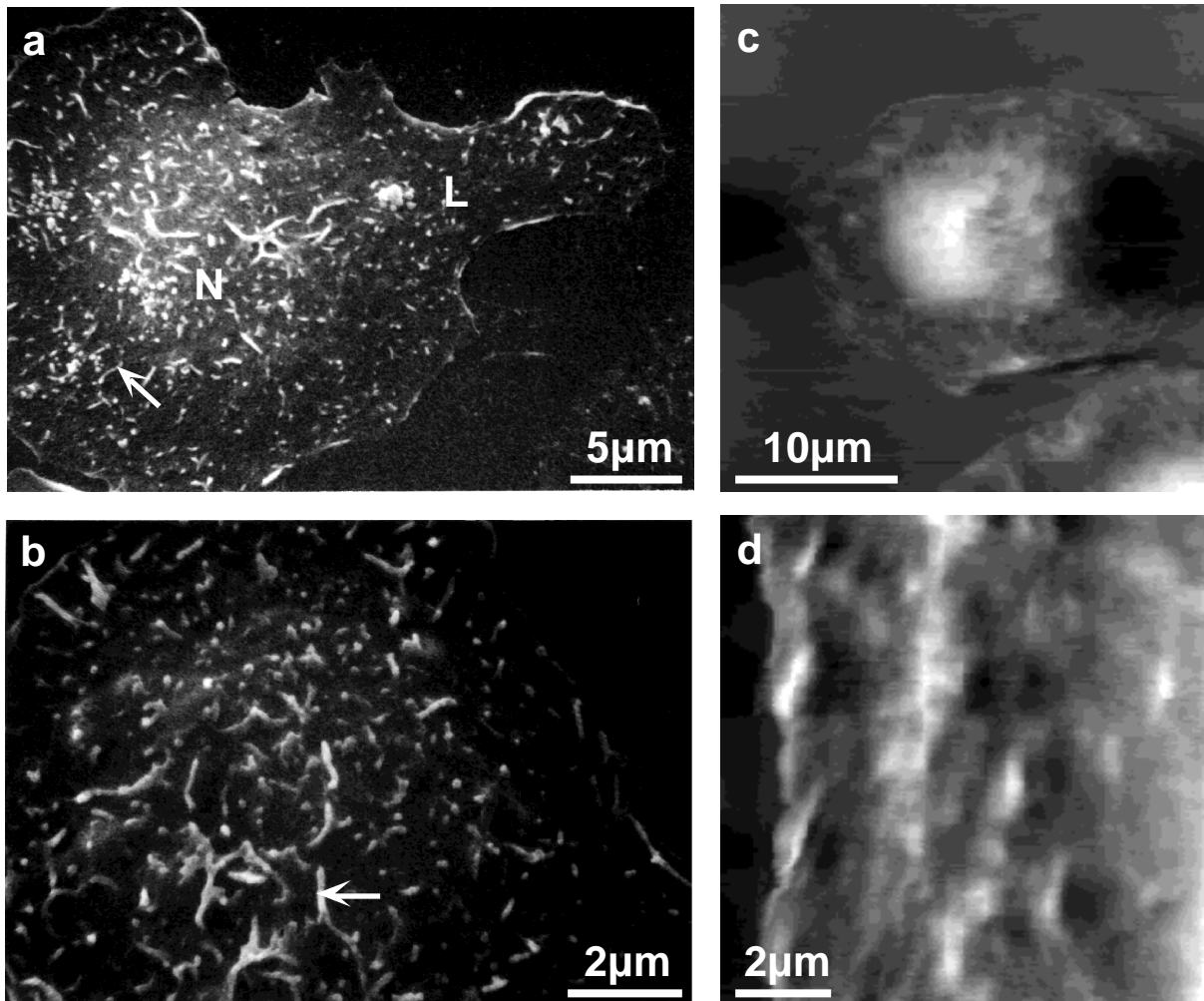


Abbildung 5.11: Vergleich elektronen- und kraftmikroskopischer Aufnahmen von Kupfferzellen. (a) SEM-Bild bei niedriger Vergrößerung. Die Präparation erfolgte 2h nach Aussäen der Zellen. Zahlreiche Mikro villi (Pfeil), der Zellkern (N) und Lamellipodia (L) sind deutlich zu sehen. (b) Detail der von Mikro villi bedeckten Zelloberfläche bei höherer Vergrößerung. (c) AFM-Bild einer lebenden Kupfferzelle, aufgenommen ca. 30min nach den Aussäen. Regelmäßige Zellform und kleine Lamellipodien deuten darauf hin, daß das Anwachsen der Zelle noch nicht beendet ist. (d) Bei höherer Vergrößerung erscheint die Oberfläche der Lamellipodien rau und wellig, wahrscheinlich weil die Mikro villi von der rasternden AFM-Spitze beiseite geschoben werden.

Unterlage verbunden ist. Bei höherer Vergrößerung erscheint die Oberfläche besonders auf den Lamellipodien rau und wellig (Abbildung 5.11d).

Die AFM-Auslenkungsbilder von lebenden Kupfferzellen zeigen die gleiche Grundstruktur, die auch in den SEM-Aufnahmen zu sehen ist. Allerdings sind die Mikro villi, die man in der elektronenmikroskopischen Abbildung sehen kann, in den AFM-Bildern nicht auflösbar. Das Vorhandensein der Mikro villi erklärt aber die beobachtete Welligkeit. Da die AFM-Spitze laterale Kräfte auf die untersuchte Probe ausübt, ist es möglich, daß empfindliche, weiche Strukturen wie die Mikro villi beim Abrastern der Probe von der Spitze beiseite geschoben werden, und daß dadurch der Cantilever leichte, unregelmäßige Auslenkungen erfährt. Um diese Annahme zu überprüfen,

kann man die Zellen und damit auch die Mikrovilli durch Fixierung steifer machen (siehe oben). Im Vergleich mit den Aufnahmen lebender Kupferzellen beobachtet man in AFM-Bildern fixierter Zellen eine körnige Oberflächenstruktur, die auf die Mikrovilli zurückzuführen sein könnte [92].

In beiden beschriebenen Experimenten kann die relativ schlechte Auflösung, die mit dem AFM erreicht wurde, mit der Weichheit der Probe erklärt werden. Wie schon in Kapitel 5.1 erläutert wurde, muß beim Abbilden mit dem AFM im Kontaktmodus eine minimale Auflagekraft aufgewandt werden. Der konkrete Betrag dieser Kraft ist durch verschiedene Komponenten des Systems wie z. B. das Signal-Rausch-Verhältnis des Geräts, Empfindlichkeit und Geschwindigkeit der Nachregelung oder die thermische Drift des Cantilevers limitiert [93]. Typische Werte liegen bei der verwendeten Anordnung im Bereich von 500pN und darunter.

Bei einer weichen Probe führt das Anlegen einer endlichen Auflagekraft dazu, daß die Spitze in die Probe gedrückt wird. Mit der Eindringtiefe hängt aber auch die Größe der resultierenden Kontaktfläche von der Auflagekraft ab. Für den Radius der Kontaktfläche gilt näherungsweise:

$$\tan(\alpha) = \frac{r}{z} \quad (1)$$

Einsetzen in die Gleichung des Hertz-Modells (Gleichung (3) in Kapitel 3.3.2) ergibt:

$$r = \sqrt{\frac{2}{\pi} \tan^2(\alpha) \frac{1-\nu^2}{E} F} \quad (2)$$

Dieser Radius kann als fundamentale Auflösungsgrenze angesehen werden, wie Radmacher *et al.* für Gelatinefilme mit einem breiten Bereich von Elastizitätsmoduli zeigen konnten [94].

Abbildung 5.12 stellt diese optimale Auflösung als Funktion der Auflagekraft für typische und extreme Werte von Elastizitätsmoduli lebender Zellen dar. Bei einer typischen Auflagekraft von 500pN ergibt sich z. B. bei einem für Zellen durchschnittlichen Elastizitätsmodul von 10kPa eine theoretische Auflösungsgrenze von etwa 140nm. Auf den mit 1kPa sehr weichen LEC sind sogar nur Strukturen auflösbar, die

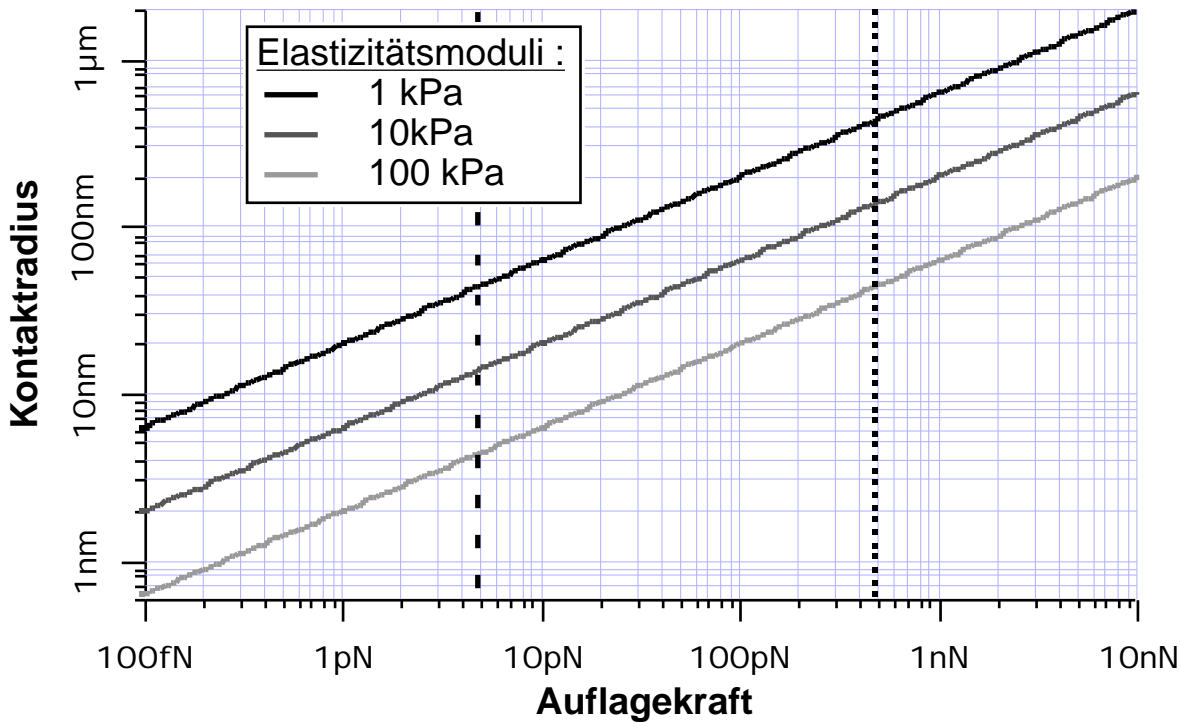


Abbildung 5.12: Mit Hilfe des Hertz-Modells berechneter Radius der Kontaktfläche zwischen AFM-Spitze und Probe in Abhängigkeit von der Auflagekraft, dargestellt für typische Werte von Elastizitätsmoduli lebender Zellen (1kPa, 10kPa, 100kPa). Bei typischen Auflagekräften von 500pN (punktierter senkrechte Linie) ergeben sich Kontaktradien von 450nm, 140nm bzw. 45nm. Für die physikalische Untergrenze der Auflagekraft (etwa 5pN) sind die Kontaktradien mit 45nm, 14nm bzw. 4,5nm um eine Größenordnung kleiner.

größer als 450nm sind. Deshalb ist es auch unmöglich, die etwa 200nm großen Fenestrae in AFM-Bildern lebender LEC zu sehen.

Gleichung (2) zeigt, daß das Auflösungsvermögen des AFM auf weichen Proben verbessert werden kann, indem die Auflagekraft minimiert wird. Die fundamentale Grenze der Auflagekraft ist durch thermische Bewegungen des Cantilevers gegeben. Da der Cantilever ein System mit einem Freiheitsgrad ist (vertikale Schwingung), führt thermische Anregung nach dem Äquipartitionstheorem der Thermodynamik zu Schwingungen mit der Energie $1/2kT$, wobei k die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur ist. Dieses Verhalten ist analog zur Brownschen Bewegung. Während die Schwingungsamplitude für weichere Cantilever größer wird, werden die Kraftfluktuationen geringer [95]. Die z. Zt. weichsten erhältlichen Cantilever, die auch in den beiden Beispielen verwendet wurden, haben Federkonstanten von 8mN/m. Daraus ergibt sich eine thermische Bewegung von 0,6Å (RMS), bzw. Kraftfluktuationen von 5pN.

Aufgrund der Differenz zwischen dieser fundamentalen Untergrenze der Auflagekraft und der derzeit durch Eigenschaften des Geräts gegebenen Grenze von 500pN besteht ein großes Potential an instrumentellen Verbesserungen. Würde dieses Potential voll ausgeschöpft, könnte die Auflösung des AFM auf weichen Proben um eine Größenordnung gesteigert werden. Da gemäß Gleichung (2) die gleiche Verbesserung der Auflösung auch durch Erhöhung des Elastizitätsmoduls der Probe um einen Faktor 100 erreicht werden kann, vermittelt Abbildung 5.9b einen ungefähren Eindruck der erreichbaren Auflösung. Damit wären also Experimente wie z. B. die Visualisierung der Fenestrae lebender LEC bereits möglich.

6. Manipulationen am Zytoskelett

Nachdem gezeigt wurde, daß Spannungsfasern lebenden Zellen lokal mechanische Stabilität verleihen und dadurch auch entscheidenden Einfluß auf Abbildungen der Zellen mit dem AFM ausüben, liegt die Vermutung nahe, daß das Aktinnetzwerk und evtl. weitere Bestandteile des Zytoskeletts die mechanischen Eigenschaften der Zellen bestimmen. Dynamische Umstrukturierungen des Zytoskeletts ermöglichen es Zellen andererseits, zu kriechen, sich zu teilen oder verschiedene Formen anzunehmen [41,96]. Die Bedeutung der ständigen Polymerisation und Depolymerisation zytoskelettaler Filamente für diese Prozesse kann durch den Einsatz chemischer Wirkstoffe wie Cytochalasin oder Colchicin untersucht werden, die in das Gleichgewicht zwischen Filamenten und zugehörigen Monomeren eingreifen [38,97]. Insbesondere der Einfluß von Cytochalasin B auf die Elastizität von Zellen wurde bereits mit anderen Techniken wie Cell Poking [15] gemessen, bisher allerdings nicht quantifiziert und lateral aufgelöst.

Die im folgenden beschriebenen Experimente demonstrieren die entscheidende Bedeutung des Aktinnetzwerks für die mechanische Stabilität lebender Zellen. Der Einfluß verschiedener F-Aktin depolymerisierender Wirkstoffe auf die Zellelastizität wird verglichen und hinsichtlich verschiedener Wirkungsmechanismen der Drogen diskutiert. Für einige der Drogen wurden auch Konzentrationsabhängigkeiten untersucht. Ähnliche Experimente wurden mit Wirkstoffen durchgeführt, die die chemische Stabilität von Mikrotubuli beeinflussen.

Für die Elastizitätsmessungen wurden Zeitserien von Force Maps auf den Zellen aufgenommen und wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben ausgewertet, um die lokalen Elastizitätsmoduli zu bestimmen. In allen Versuchen wurde eine Referenz-Force-Map aufgenommen, bevor der Wirkstoff zugegeben wurde.

Neben den bereits beschriebenen Hühnerherz- und Kupfferzellen kamen bei den Untersuchungen der Effekte der verschiedenen Wirkstoffe vor allem Fibroblasten der 3T3- und NRK-Zelllinien zum Einsatz. Diese Zellen können besonders einfach in Standardmedien kultiviert und vermehrt werden (siehe Anhang A.1.2) und sind durch ihr ausgeprägtes Zytoskelett interessante Proben für AFM-Experimente. In ihren aktiven Regionen strecken kriechende Fibroblasten häufig flache Lamellipodien aus, die ein dichtes Geflecht von Aktinfilamenten enthalten. Spannungsfasern treten bevorzugt parallel zu stabilen Bereichen auf. Die feste Adhäsion von Fibroblasten auf

unbehandelten Plastikpetrischalen und ein flacher Zellkörper mit typischen Höhen von 2-3µm über dem Kern erleichtern das Arbeiten mit diesen Zellen erheblich. Über ausgedehnte Zeiträume ist Abbilden und Force Mapping möglich, ohne daß nennenswerte Umstrukturierungen im Zytoskelett auftreten.

6.1 Eigenschaften der Wirkstoffe

Um den Einfluß der einzelnen Komponenten des Zytoskeletts auf die Zellelastizität zu ermitteln, wurden verschiedene Zelltypen mit Cytochalasin B oder D, Latrunculin A, Jasplakinolide, Phalloidin, Taxol, Colchicin und Colcemid behandelt.

Die Cytochalasine sind eine Familie von Giften, die aus verschiedenen Pilzen gewonnen werden. Cytochalasine binden am Plus-Ende von Aktinfilamenten (Capping, siehe Kapitel 2.3) und verhindern so die Anlagerung weiterer Monomere [38-40]. Am Minus-Ende des Filaments gehen unter Bedingungen, wie sie typischerweise in lebenden Zellen herrschen, netto Monomere in Lösung. Daher führt Capping des Plus-Endes zur Depolymerisation des Filaments. In kriechenden Zellen bewirkt die Behandlung mit Cytochalasin eine reversible Unterbrechung der Bewegung und ein Zusammenziehen der Zelle. Die Spezifität der Cytochalasine für Aktin ist allerdings umstritten. Cytochalasin B, aber nicht Cytochalasin D hemmt zusätzlich den intrazellulären Glukosetransport. Beide Wirkstoffe bewirken eine Aggregation kurzer Aktinfilamente in filzartigen Klumpen, die über das gesamte Zytoplasma verteilt sind und große zystische Vakuolen umschließen [98-100]. Generell kann man Nebeneffekte der Cytochalasine nur schwer ausschließen.

Abbildung 6.1 veranschaulicht die Wirkung von Cytochalasin B in einer Zeitserie von Auslenkungsbildern, die auf einem flachen Lamellipodium eines 3T3-Fibroblasten aufgenommen wurden. Bei einer Abtastrate von 1Hz (d. h. eine Zeile pro Sekunde) ergibt sich etwa eine Aufnahmezeit von 5min pro Bild. Nachdem das erste Bild aufgenommen war, wurden 10µM Cytochalasin B zugegeben und mit Hilfe einer Pipette gründlich verteilt (siehe Anhang A.2). Die Bilder zeigen, wie die Aktinfilamente allmählich abgebaut werden, während sich das gesamte Lamellipodium langsam zurückzieht. Feinere Filamente verschwinden fast vollständig innerhalb der ersten 10-15min. Größere Strukturen, wahrscheinlich Spannungsfasern, bleiben bis zu 30min lang erhalten (Pfeile in Abbildung 6.1a und g).

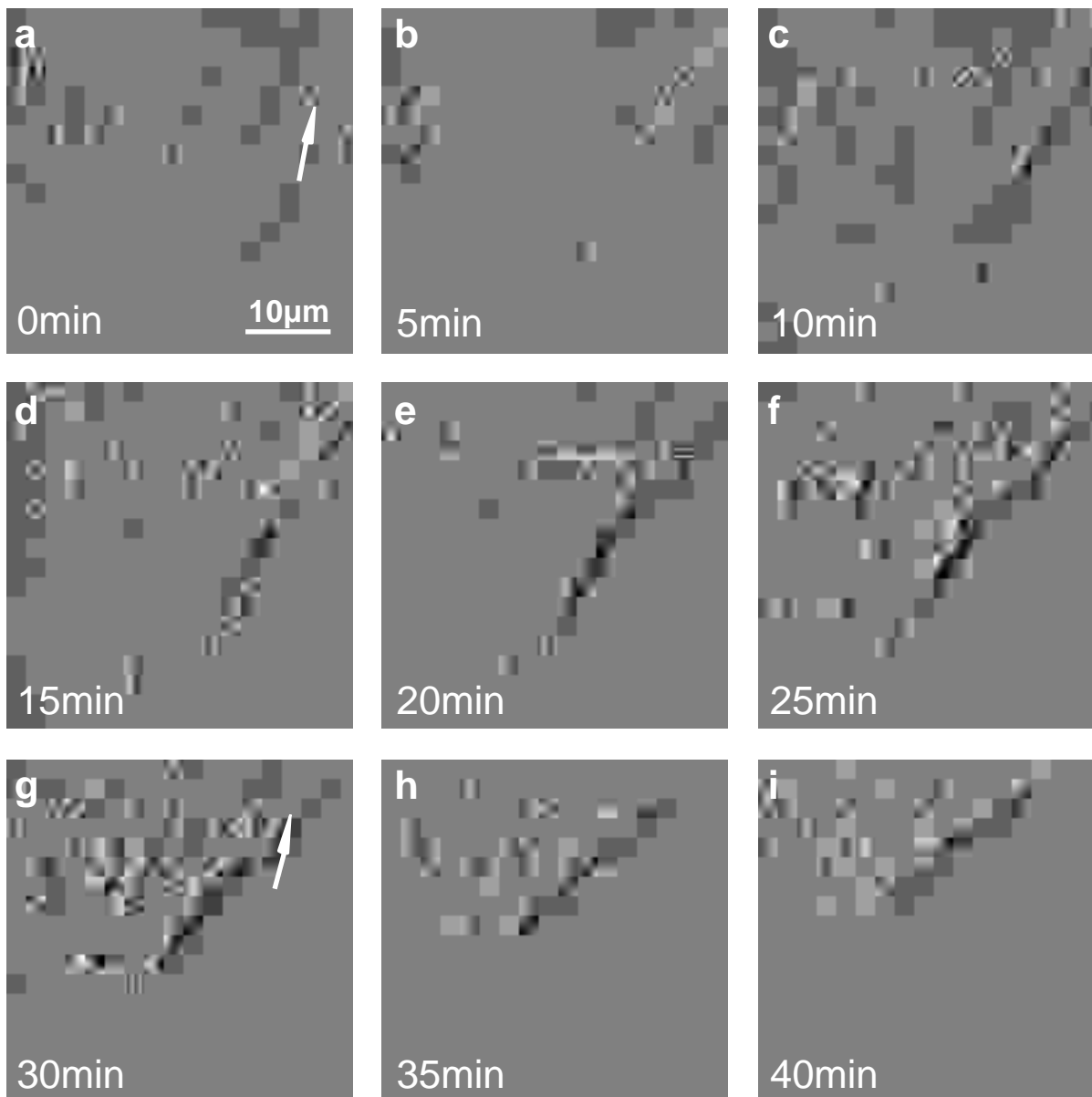


Abbildung 6.1: Zeitserie von Auslenkungsbildern eines lebenden 3T3-Fibroblasten, aufgenommen während des Abbaus von Aktinfilamenten mit 10µM Cytochalasin B. (a) Referenz. (b-i) Aufeinanderfolgende Bilder nach Zugabe von Cytochalasin B. Das Aktinnetzwerk verschwindet allmählich während sich das Lamellipodium zurückzieht. Spannungsfasern bleiben länger erhalten als feinere Strukturen (Pfeile in (a) und (g))

Latrunculin A, ein weiterer Inhibitor der Aktinpolymerisation wird aus dem im Roten Meer beheimateten Schwamm *Latrunculia Magnifica* isoliert [101]. Der Wirkstoff bildet 1:1-Komplexe mit Aktinmonomeren und verschiebt dadurch das Gleichgewicht zwischen Monomeren und Aktinfilamenten [102,103]. Das führt in zahlreichen Zelltypen zum Abbau des Aktinnetzwerks [104-106]. Latrunculin A kann durch die Membran in die Zelle gelangen und wirkt so schnell wie die Cytochalasine [101,103]. Jasplakinolide, ein erst vor kurzer Zeit entdeckter Wirkstoff, der das Aktinnetzwerk angreift, wird ebenfalls aus Schwämmen (*Jaspis Johnstonii*) präpariert. Informationen

bezüglich der Wirkung von Jasplakinolide sind widersprüchlich, deuten aber auf eine Konzentrations- und Zelltypabhängigkeit hin. In menschlichen Prostatakarzinomzellen wird das Aktinzytoskelett bei Konzentrationen von $0,1\mu\text{M}$ zerstört [107,108]. Die antiproliferative Aktivität gegen diese Zellen macht Jasplakinolide zu einem potentiellen Antitumorwirkstoff [109]. Eine erhöhte Steifheit von Neutrophilen, die durch Behandlung mit $10\mu\text{M}$ Jasplakinolide hervorgerufen wird, ist durch erhöhten Widerstand der Zellen gegen ein Ansaugen mit der Pipette erkennbar [110]. In Leberendothelzellen bewirken schon sehr geringe Jasplakinolide-Konzentrationen von etwa 10nM einen Abbau von Aktinfilamenten und Spannungsfasern und eine Aggregation kurzer Aktinfilamente [111].

Die Wirkungsweise von Phalloidin wurde bereits in Kapitel 5.2 erläutert.

Colchicin und Colcemid sind Wirkstoffe, die durch die Bindung einzelner Tubulinmoleküle die Mitose der Zelle unterbrechen können [97,112]. Im Gegensatz dazu bindet Taxol fest an intakte Mikrotubuli, wodurch diese chemisch stabilisiert werden und Tubulin-Polymerisation angeregt wird [113,114].

6.2 Konvektion verzögert den Effekt der Wirkstoffe

In Abbildung 6.2 sind Elastizitätsbilder einer Kupferzelle zu sehen, die während der Behandlung der Zelle mit Cytochalasin B aufgenommen wurden. Abbildung 6.2a zeigt die Referenz-Force-Map vor der Zugabe des Wirkstoffs. Die untersuchte Region umfaßt einen großen Teil der Zelle einschließlich des Kerns (links) und zweier flacher Lamellipodia (oben und unten). Zunächst wurde Cytochalasin B zugegeben, so daß die Konzentration in der Petrischale $4\mu\text{M}$ betrug. Während der folgenden 100min wurden fünf weitere Force Maps aufgenommen, von denen die zweite in Abbildung 6.2b zu sehen ist. Danach wurde die Konzentration von Cytochalasin B auf $20\mu\text{M}$ gesteigert. Das folgende Elastizitätsbild (Abbildung 6.2c) zeigt schon eine leichte globale Abnahme des Elastizitätsmoduls der Zelle, insbesondere in der unteren, später aufgenommenen Hälfte der Force Map. Allerdings sind die beobachtbaren Veränderungen in der Elastizität hier noch nicht sehr ausgeprägt. Der Streifen in der unteren Bildhälfte ist auf thermische Drift des Cantilevers zurückzuführen, die kurzzeitig vom Triggermodus nicht kompensiert werden konnte, so daß die Kraftkurven nicht im richtigen Höhenbereich aufgenommen wurden. Innerhalb des Streifens sind die Kraftkurven verzerrt, aber die Messungen in den umliegenden Gebieten sind

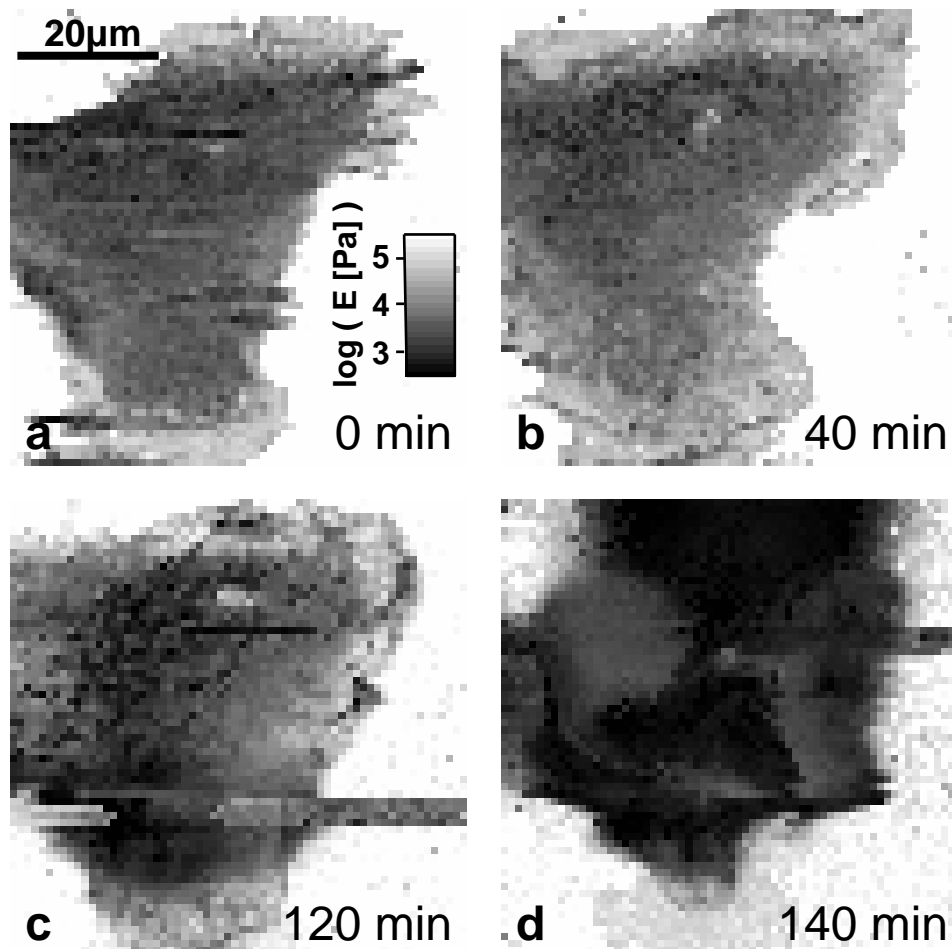


Abbildung 6.2: Zeitserie von Elastizitätsbildern einer lebenden Kupferzelle, aufgenommen während des Abbaus von Aktinfilamenten mit Cytochalasin B. (a) Referenz, das Bild zeigt den Kern und zwei Lamellipodia. (b) Zweites von fünf aufeinanderfolgenden Elastizitätsbildern unter Einfluß von 4µM Cytochalasin B. In dieser Phase breitet sich die Zelle aus, Elastizitäten ändern sich nicht. (c) Elastizitätsbild, aufgenommen direkt nach Erhöhung der Konzentration von Cytochalasin B auf 20µM. Während der Aufnahme der Force Map (zeilenweise von oben nach unten innerhalb von 18min) bewirkt der beginnende Abbau des Aktinnetzwerks eine Abnahme der Elastizitäten. Im nächsten Elastizitätsbild (d) sind die gemessenen Elastizitätsmoduli bereits deutlich geringer, und die Form der Zelle hat sich verändert.

dadurch nicht beeinflusst. Im unmittelbar anschließend aufgenommenen Elastizitätsbild (Abbildung 6.2d), also 20min später, erscheint die Zelle bereits wesentlich runder. Das untere Lamellipodium wurde vollständig zurückgezogen und die berechneten Elastizitätsmoduli sind über die gesamte Zelle hinweg deutlich geringer. Zwei weitere Force Maps wurden noch aufgezeichnet (hier nicht gezeigt), bevor sich die Zelle vollständig von der Unterlage gelöst hatte. Die zugehörigen Elastizitätsbilder zeigen ähnliche Elastizitätswerte, aber starke Formänderungen der Zelle, die vermutlich auf das allmähliche Ablösen der Lamellipodien vom Substrat zurückzuführen sind.

In diesem Experiment wurde der Effekt eines Abbaus des Aktinnetzwerks durch Cytochalasin B auf die Zellelastizität quantitativ und lateral aufgelöst gemessen. Eine Konzentrationsabhängigkeit wurde für diesen Zelltyp nicht getestet. Die Behandlung mit 4µM Cytochalasin B bewirkt in vielen Zelltypen einen fluoreszenzoptisch beobachtbaren Abbau von Aktinfilamenten (M. Thie, H.-J. Schnittler, pers. Komm.) führte aber hier innerhalb von 100min nicht zu meßbaren Veränderungen der elastischen Eigenschaften. Der Effekt auf die Elastizität ist also entweder zu klein, um mit dem AFM gemessen werden zu können, oder es gibt eine untere Konzentrationsgrenze. Der zweite Teil des Experiments, bei dem die Zelle mit 20µM Cytochalasin B behandelt wurde, bestätigt, daß die Zerstörung des Aktinnetzwerks einen drastischen Rückgang des Elastizitätsmoduls der Zelle zur Folge hat.

Die Verzögerung zwischen der Erhöhung der Cytochalasin-Konzentration auf 20µM und der Beobachtung erster deutlicher Elastizitätsänderungen ist größer als erwartet (5 Minuten, gemessen von Braet *et al.* [115]). Während der ersten 20 Minuten, in denen die in Abbildung 6.2c gezeigte Force Map aufgenommen wurde, müßte der Effekt schon deutlicher sein. Die Art und Weise der Wirkstoffzugabe erklärt die Diskrepanz. Nachdem ein Tropfen hochkonzentrierter Stammlösung in die Petrischale gegeben wird, muß die Droge noch bis zur untersuchten Zelle gelangen. Dadurch wird der Abbau des Aktinnetzwerks verzögert. Um die Diffusionszeit abzuschätzen, werden eine typische Diffusionskonstante D für Proteine in Wasser von $10^{-8} \text{m}^2/\text{s}$ und eine Entfernung x von 1cm zwischen der Zelle und dem Ort, an dem die Stammlösung zugegeben wurde, angenommen. Damit ergibt sich aus der Diffusionsgleichung:

$$t = \frac{(x)^2}{2 D} \quad (1)$$

eine Verzögerungszeit von 5000 Sekunden. Da Effekte oft schon in der direkt nach Wirkstoffzugabe aufgenommenen Force Map, also nach weniger als 1200s zu beobachten waren, kann Diffusion nicht der entscheidende Mechanismus für den Wirkstofftransport sein.

In der Petrischale tritt allerdings auch Konvektion auf, die man daran erkennt, daß gelegentlich während des Experiments vom Substrat abgelöste Zellen durch das

Gesichtsfeld des optischen Mikroskops treiben. Diese Konvektion wird durch die Bewegung der Fluidzelle des AFM in der Petrischale unterstützt. Eine grobe Abschätzung der maximalen Driftgeschwindigkeit der abgelösten Zellen ergibt eine konvektionsbedingte Transportzeit für die Drogen von 5-10min und erklärt somit die beobachtete Verzögerung. Die Konvektion wird allerdings stark z. B. vom Temperaturgradienten zwischen dem Labor und der gasdichten Plexiglaskiste, unter der sich das AFM befindet, beeinflusst und unterliegt daher großen täglichen Schwankungen. Ein Durchschnittswert für die Abnahme des Elastizitätsmoduls in den weicheen Regionen einer Zelle kann mit Hilfe von Elastizitätshistogrammen ermittelt werden. Das ist in Abbildung 6.3 anhand der Histogramme der in Abbildung 6.2 gezeigten Elastizitätsbilder veranschaulicht. Die Elastizitätsmoduli (in Pascal) sind dazu logarithmiert worden, und über 50 äquidistante Bereiche zwischen 1,9 und 4,9 wurden dann Histogramme erstellt. Für jedes der Elastizitätsbilder ergibt sich ein einzelnes Maximum in der Elastizitätsverteilung in diesem Intervall. Das Substrat liefert ein weiteres Maximum außerhalb dieses Bereichs bei etwa $\log(E[\text{Pa}])=6,5$. Die wenigen Punkte zwischen diesen Maxima stammen von sehr flachen Teilen der Lamellipodi-

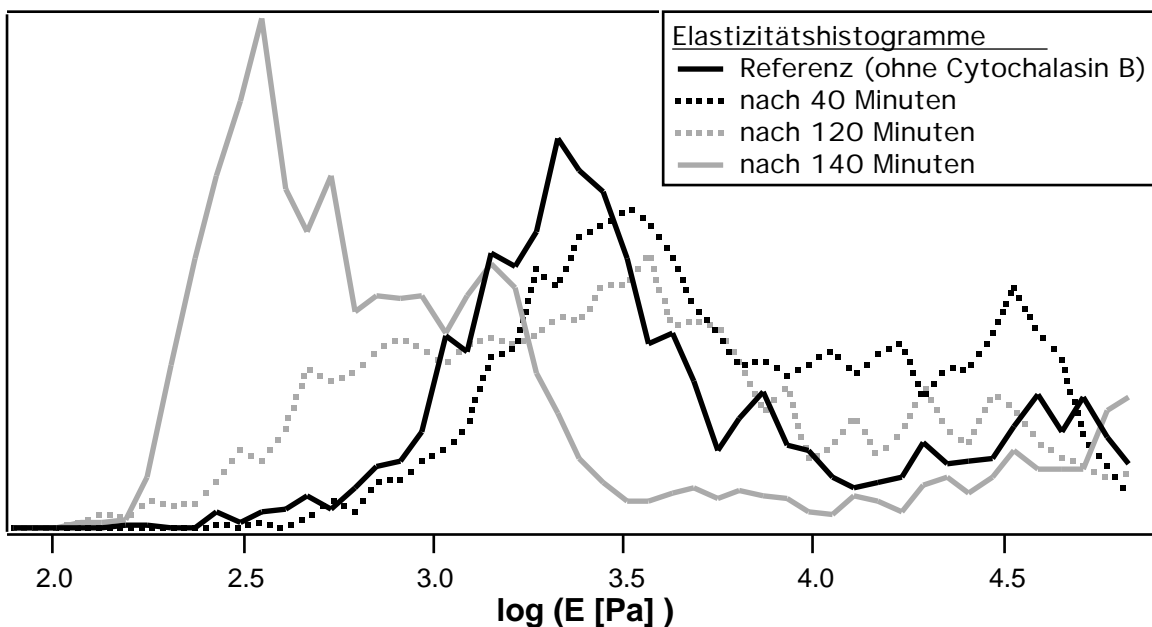


Abbildung 6.3: Histogramme der Elastizitätsbilder aus Abbildung 6.2. Die Elastizitätsverteilung für jede der Figuren zeigt ein deutliches Maximum, das die mittlere Elastizität angibt. Die Maxima liegen für die Referenz (Abbildung 6.2a) und das bei geringer Cytochalasin B-Konzentration aufgenommene Elastizitätsbild (Abbildung 6.2b) bei etwa 3kPa. Das Ausschmieren des Maximums im Histogramm der Abbildung 6.2c resultiert aus der Abnahme des Elastizitätsmoduls während der Aufnahme der Force Map. Nach 40-minütiger Einwirkung von 20 μ M Cytochalasin B (Abbildung 6.2d) ist das Maximum zu etwa 7-fach niedrigeren Werten verschoben.

en, in denen zu hohe Elastizitätsmoduli berechnet werden (vgl. Kapitel 3.3.6). Ein mittlerer Wert für die Abnahme der Zellelastizität kann aus den Histogrammen gewonnen werden, indem die Elastizitätsmoduli, bei denen die Maxima in den Histogrammen auftreten, durcheinander dividiert werden. Im Fall der Abbildung 6.2 nimmt die mittlere Elastizität um den Faktor 7 ab. Die verzerrte Form des Histogramms der Abbildung 6.2c (graue punktierte Linie in Abbildung 6.3) spiegelt die experimentelle Situation wieder. Cytochalasin B wurde unmittelbar vor Aufnahme der zugehörigen Force Map zugegeben. Weil die Aufnahme einer Force Map und der Drogeneffekt auf ähnlichen Zeitskalen stattfinden, trat der Effekt während der Aufnahme der Force Map ein. Die resultierende Verschiebung der Elastizitätsmoduli zu kleineren Werten innerhalb des zugehörigen Elastizitätsbildes führt zum Ausschmieren des Maximums nach rechts im Histogramm.

6.3 Das Aktinnetzwerk verleiht Tierzellen mechanische Stabilität

Der Effekt von Cytochalasin B auf den Elastizitätsmodul wird in Abbildung 6.4 in einer Zeitserie von Elastizitätsbildern eines 3T3-Fibroblasten demonstriert. Nach Aufnahme der Referenz-Force-Map (Abbildung 6.4a) wurden 10 μ M Cytochalasin B zugegeben. Spannungsfasern sind deutlich zu sehen (Pfeil). Innerhalb von 60min reduziert sich der mittlere Elastizitätsmodul um einen Faktor 2,2. Das zeigt bereits, daß ein Abbau von Aktinfilamenten die mechanische Stabilität der Zelle wesentlich beeinträchtigt. Spannungsfasern sind zu diesem Zeitpunkt immer noch vorhanden, verschwinden nach 120min allerdings (Abbildung 6.4g). Über das gesamte Experiment hinweg wurde eine Abnahme des mittlere Elastizitätsmoduls der Zelle um einen Faktor 3,1 gemessen.

Die Verzögerung zwischen der Zugabe des Wirkstoffs und den ersten meßbaren Auswirkungen auf die Zellelastizität scheint von der Drogenkonzentration abzuhängen. Bei höheren Konzentrationen (50-100 μ M) greift Cytochalasin B die Zellen wesentlich schneller an, so daß sich diese typischerweise schon innerhalb der ersten 10 Minuten, d. h. bevor die erste Force Map vollständig aufgenommen ist, zusammenziehen und vom Substrat lösen. Bei sehr niedrigen Konzentrationen (1-4 μ M) wurden innerhalb von 3h keine deutlichen Auswirkungen auf die Zellelastizität beobachtet. Im Bereich mittlerer Konzentrationen variieren die Zeitkonstanten für die Drogenwirkung allerdings erheblich (20-120min für 10 μ M Cytochalasin B).

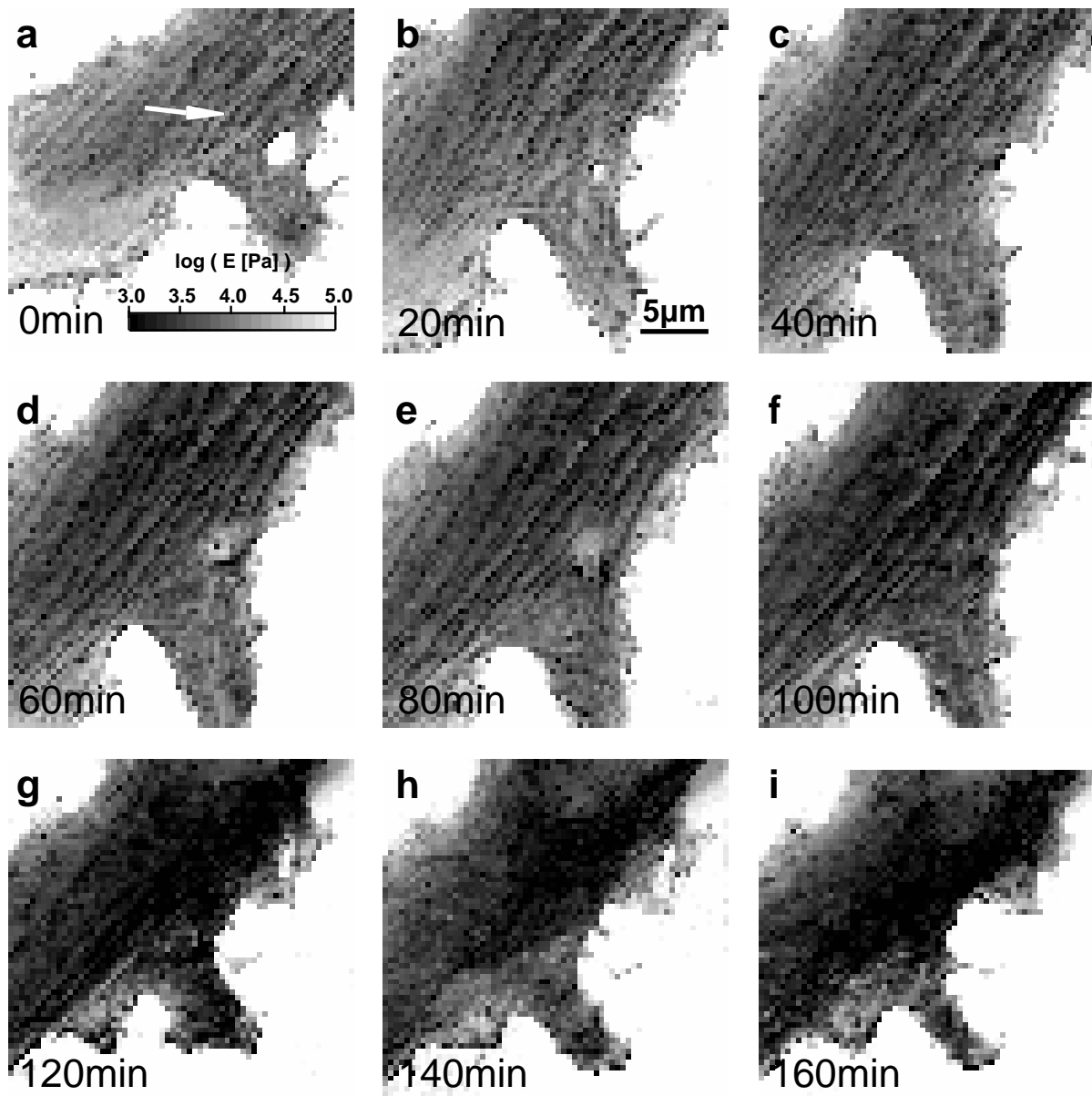


Abbildung 6.4: Zeitserie von Elastizitätsbildern eines lebenden 3T3-Fibroblasten, aufgenommen während des Abbaus von Aktinfilamenten mit 10µM Cytochalasin B. (a) Referenz, der Pfeil zeigt eine Spannungsfaser. (b-i) Aufeinanderfolgende Elastizitätsbilder zeigen eine allmähliche Abnahme des mittleren Young-Moduls der Zelle. Spannungsfasern verschwinden nach etwa 100min (f). Erst danach ändert sich auch die Zellform: Lamellipodien ziehen sich zurück.

Abbildung 6.5 zeigt ein ähnliches Experiment wie Abbildung 6.4, jedoch wurde hier eine Hühnerherzzelle untersucht. Man beobachtet ebenfalls ein Weicherwerden der Zelle um den Faktor 3, in diesem Fall schon nach 20 Minuten. Danach rundet sich die Zelle und beginnt, Lamellipodien zurückzuziehen.

In den Experimenten mit Cytochalasin B wurden keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung der Substanz auf die unterschiedlichen Zelltypen festgestellt. Im Fall der Fibroblastenzelllinien 3T3 und NRK betreffen die beobachteten Unterschiede die allgemeine Morphologie, insbesondere das generell stärker ausgeprägte Span-

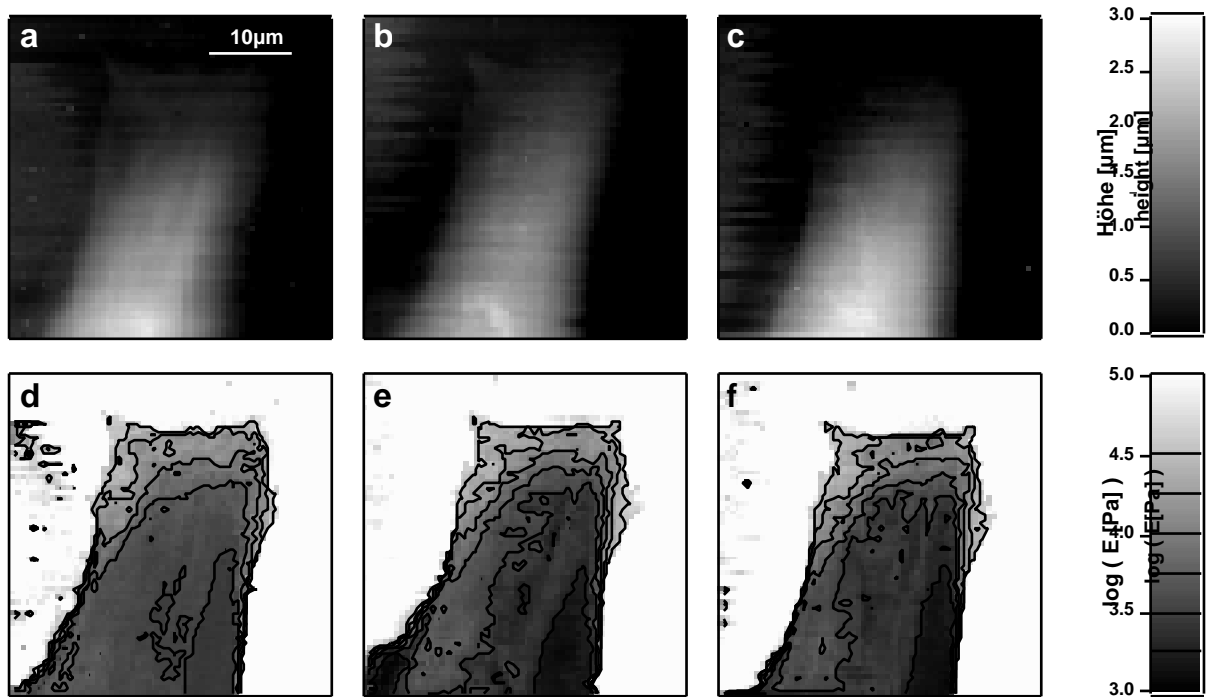


Abbildung 6.5: Zeitserie von realen Höhenbildern und Elastizitätsbildern einer lebenden Hühnerherzzelle, aufgenommen während des Abbaus von Aktinfilamenten mit 10µM Cytochalasin B. (a,d) Referenz. (b,e) Deutliche Abnahme der mittleren Elastizität schon nach 20 Minuten. (c,f) Lamellipodien ziehen sich zurück, die Zelle zieht sich zusammen.

nungsfasernetzwerk in NRK-Fibroblasten, das dafür verantwortlich ist, daß diese Zellen weniger beweglich aber stabiler sind, besser an die Unterlage adhärieren und deshalb bessere Proben für AFM-Experimente darstellen. Die Messungen an Hühnerherzzellen (Abbildung 6.5), bei denen es sich vermutlich auch um Fibroblasten handelt (siehe Anhang A.1.1) zeigen ebenfalls kaum Unterschiede im beobachteten Effekt einer Behandlung mit Cytochalasin B. Auch bei Kupfferzellen ist der qualitative Effekt gleich (Abbildung 6.2), allerdings wird der mittlere Elastizitätsmodul wesentlich stärker reduziert (um den Faktor 7, siehe Abbildung 6.3). Das könnte eine Folge der unterschiedlichen Zellmorphologie sein. Kupfferzellen besitzen praktisch keine Spannungsfasern und ihre Oberfläche ist von Mikrovilli bedeckt (Abbildung 5.11), deren stützende Aktinbündel von den verwendeten Wirkstoffen abgebaut werden. Die stärkere Reaktion der Kupfferzellen auf Cytochalasin B könnte aber auch ein Artefakt sein, das durch ein teilweises Ablösen des Lamellipodiums verursacht wurde. Diese Vermutung wird gestützt durch die Tatsache, daß Kupfferzellen auf die Behandlung mit Latrunculin A ähnlich wie die Fibroblasten reagieren (Abbildung 6.8). Ansonsten führte der durch Cytochalasin B verursachte Abbau von Aktinfilamenten in allen untersuchten Zelltypen (Abbildung 6.4, Abbildung 6.5) zu einer Reduktion des

mittleren Elastizitätsmoduls um etwa den Faktor 3, also zu einem Verlust an mechanischer Stabilität. Auch die Behandlung der Zellen mit anderen Substanzen, die das Aktinnetzwerk angreifen (Cytochalasin D, Latrunculin A, Jasplakinolide - siehe folgende Abschnitte) bewirkte in allen Fällen eine ähnlich deutliche Abnahme des mittleren Elastizitätsmoduls der Zellen. Damit ist die allgemeine Bedeutung des Aktinnetzwerks für die mechanischen Eigenschaften lebender Tierzellen gezeigt.

6.4 Verschiedene Wirkmechanismen der Drogen wurden beobachtet

Die Messungen der Auswirkungen eines chemischen Abbaus des Aktinnetzwerks auf die elastischen Eigenschaften der Zellen erlauben es nicht nur, die allgemeine Bedeutung des Aktinnetzwerks für die mechanische Stabilität der Zellen zu demonstrieren. Es ist darüber hinaus möglich, verschiedene Wirkmechanismen der Drogen zu beobachten.

6.4.1 Cytochalasin D bewirkt eine Aggregation von Aktin

Ein NRK-Fibroblast, der mit Cytochalasin D behandelt wurde, ist in Abbildung 6.6 zu sehen. Vor den Elastizitätsmessungen wurden AFM-Bilder der Zelle aufgenommen (Abbildung 6.6a (Höhe) und Abbildung 6.6b (Auslenkung)). Deutlich kann man Spannungsfasern erkennen, die quer über die nukleare und perinukleare Region verlaufen (Pfeile in Abbildung 6.6b). Dagegen erscheint die Zelloberfläche im realen Höhenbild (Abbildung 6.6c), das aus der Referenz-Force-Map berechnet wurde, wieder völlig unstrukturiert. Das zugehörige Elastizitätsbild ist in Abbildung 6.6d zu sehen. Nach Aufnahme dieser Referenz-Force-Map wurden 10 μ M Cytochalasin D zugegeben. Ein leichter Rückgang der Elastizität kann schon in der nächsten Force Map (Abbildung 6.6e) beobachtet werden, die im Zeitraum von 0 (unten) bis 20min (oben) nach Zugabe des Wirkstoffs aufgenommen wurde. Während der folgenden 20min (Abbildung 6.6f) nahm der mittlere Elastizitätsmodul der Zelle im Vergleich zur Referenz-Force-Map um einen Faktor 2,9 ab. Nach 60min wurde eine deutliche Segmentierung des Zytosols beobachtet (Abbildung 6.6g (E) und Abbildung 6.6h (reale Höhe)).

Unmittelbar nach Aufnahme dieser Force Map wurde die Zelle fixiert, permeabilisiert und mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Abbildung 6.6i zeigt das resultierende Fluoreszenzbild. Die Färbung ist spezifisch für das filamentäre Aktin der Zelle, das nach der

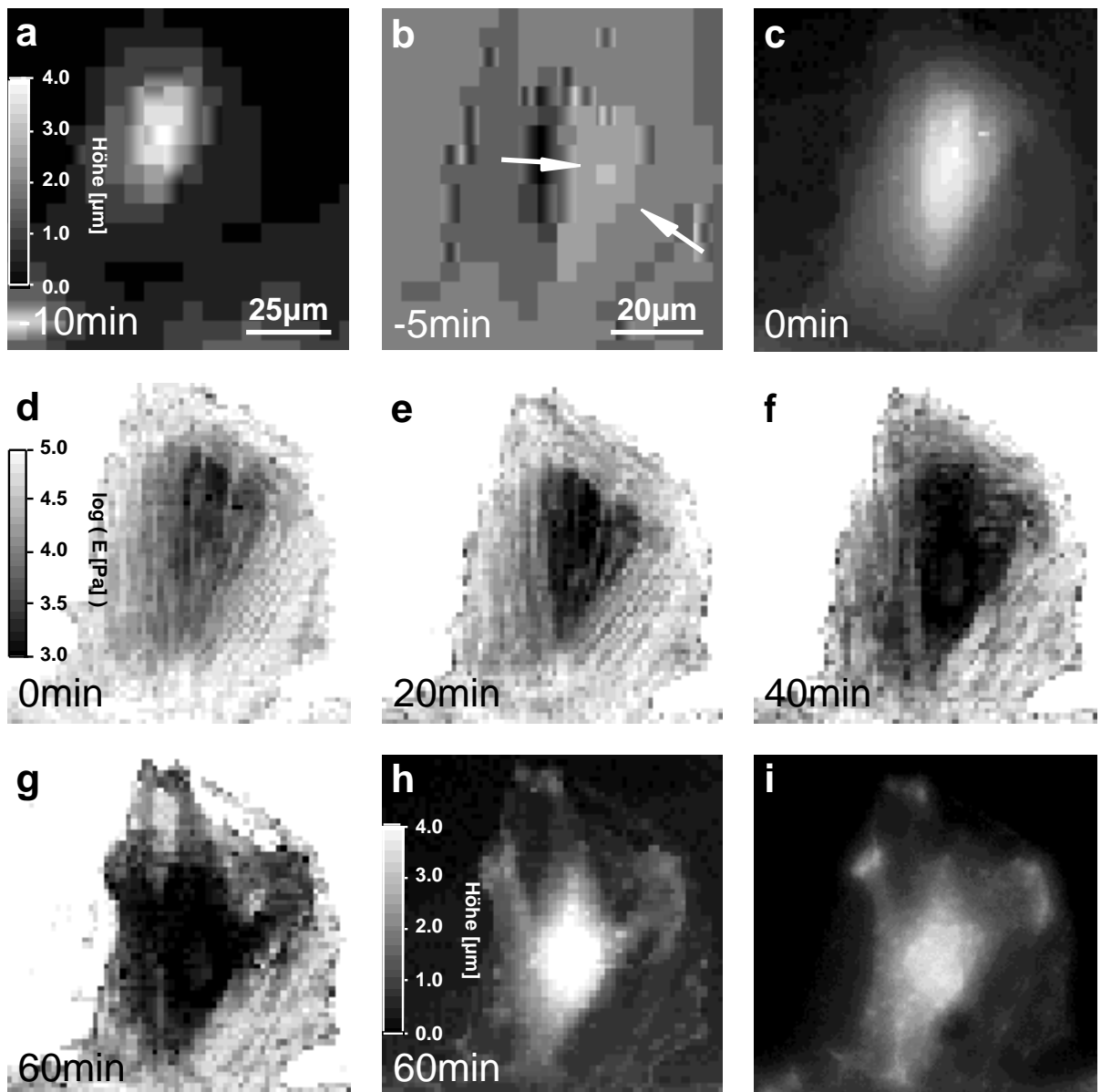


Abbildung 6.6: Zeitserie von Elastizitätsbildern eines lebenden NRK-Fibroblasten, aufgenommen während des Abbaus von Aktinfilamenten mit 10µM Cytochalasin D in Korrelation mit AFM- und Fluoreszenzbildern. (a) AFM-Höhenbild. (b) AFM-Auslenkungsbild. Die Pfeile zeigen Spannungsfasern. (c) Reales Höhenbild, berechnet aus der Referenz-Force-Map. (d) Zugehöriges Referenzelastizitätsbild. (e,f) Elastizitätsmoduli nehmen innerhalb der ersten 40min allmählich ab. Elastizitätsbild (g) und reales Höhenbild (h) nach 60min zeigen eine starke Segmentierung im Zytosol. Im zugehörigen Fluoreszenzbild (i) können die Strukturen als Aktinklumpen identifiziert werden.

Behandlung mit Cytochalasin D größtenteils nur noch aus kurzen, nicht quervernetzten Aktin-Oligomeren besteht.

Die Messungen zeigen eine starke Korrelation zwischen aktinreichen Gebieten, Regionen, die im Vergleich zum Referenzelastizitätsbild weich sind (Abbildung 6.6g), und hohen Teilen der Zelle (Abbildung 6.6h). Das zeigt, daß sich die im Zytosol beobachteten Aggregationen aus Bestandteilen des Aktinnetzwerks zusammensetzen.

Gebiete der Zelle, die dem Fluoreszenzbild zufolge aktinarm sind, sind typischerweise weniger als 300nm hoch (vgl. Abbildung 6.6h und Abbildung 6.6i). In solchen flachen Regionen werden aufgrund des Einflusses des unter der Zelle befindlichen harten Substrats größere scheinbare Elastizitätsmoduli berechnet (siehe Kapitel 3.3.6). Dieser Effekt wird noch verstärkt durch das Fehlen quervernetzter Aktinfilamente, das eine reduzierte mechanische Stabilität der Zelle bewirkt.

Abbildung 6.7 zeigt, daß auch bei 3T3-Fibroblasten die Behandlung mit Cytochalasin D zu einer starken Segmentierung des Zytosols der Zelle führt. Dieser Effekt wurde in allen Experimenten für beide Fibroblastenzelllinien bei Konzentrationen des Wirkstoffs von 5-30µM beobachtet (Abbildung 6.6g, h bzw. Abbildung 6.7d-f). Durch die Korrelation mit den Fluoreszenzdaten (Abbildung 6.6i) ist bekannt, daß es sich bei den filzigen Aggregaten um Klumpen aus kurzen Aktinfilamentstücken handelt. Typischerweise ging der Segmentierung des Zytosols ein Weicherwerden der Zelle voraus (Abbildung 6.6f), das den Abbau der Aktinfilamente anzeigt. Die Aggregate bildeten sich aber erst simultan zum Verschwinden der Spannungsfasern. Daraus kann

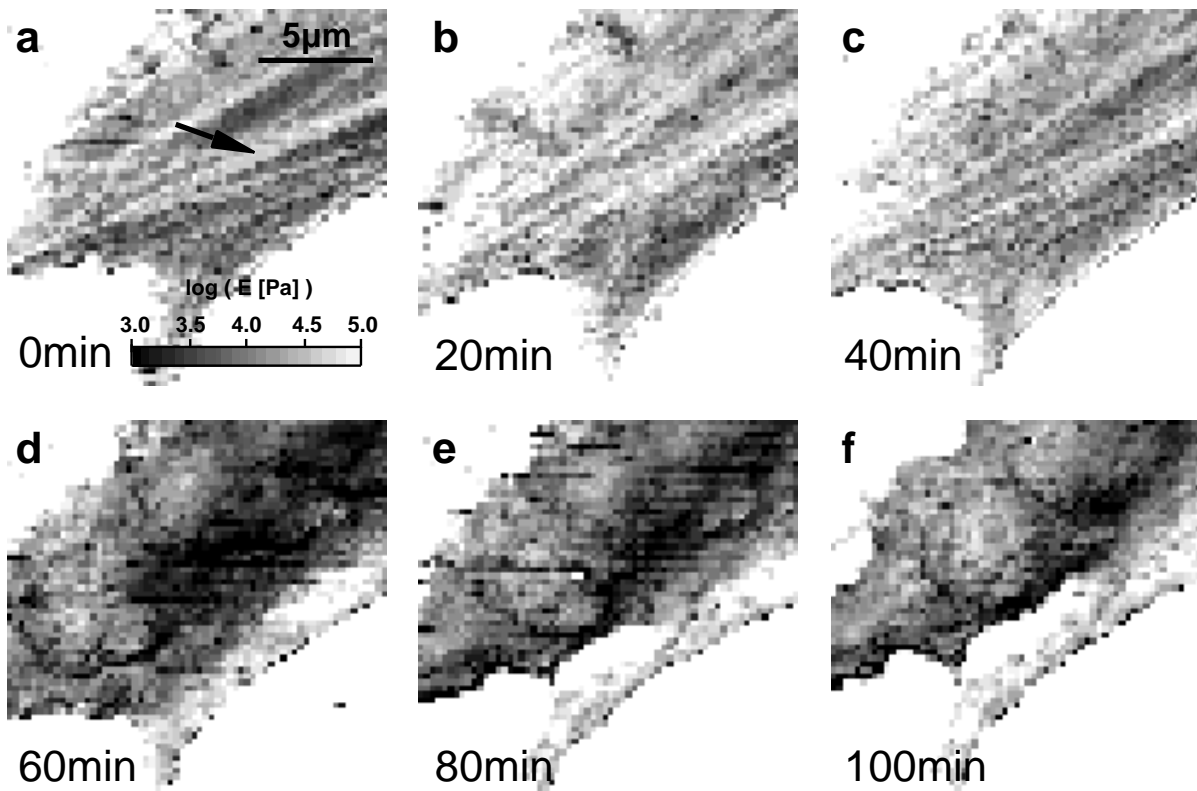


Abbildung 6.7 Zeitserie von Elastizitätsbildern eines lebenden 3T3-Fibroblasten, aufgenommen während des Abbaus von Aktinfilamenten mit 0,1µM Cytochalasin D. (a) Referenz. Der Pfeil zeigt eine Spannungsfaser. (b,c) Geringe Veränderungen in den ersten 40min. (d-f) Spannungsfasern verschwinden nach etwa 60min. Der mittlere Elastizitätsmodul der Zelle nimmt deutlich ab, und das Zytosol wird stark segmentiert.

man schließen, daß die aggregierten Filamentstücke aus den Spannungsfasern stammen.

Bei gleichen Konzentrationen von Cytochalasin B und D ist die Abnahme des mittleren Elastizitätsmoduls der Zelle vergleichbar (Abbildung 6.4f, Abbildung 6.5e, Abbildung 6.6f und Abbildung 6.7d). Das zeigt, daß beide Substanzen gleichermaßen starke F-Aktin-abbauende Wirkung haben. In Folge einer Behandlung mit Cytochalasin B wurde jedoch nie eine Aktin-Aggregation beobachtet. Cytochalasin D scheint also entgegen z. T. anderslautenden Aussagen in der Literatur (siehe Kapitel 6.4) vergleichsweise schwerwiegendere Störungen anderer zellulärer Prozesse zu bewirken.

Die gemessene Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Cytochalasin D ist mit dem für Cytochalasin B beobachteten Verhalten vergleichbar. Die Zellelastizitäten verändern sich unter Einfluß von $1\mu\text{M}$ Cytochalasin D innerhalb von 3h kaum, und bei sehr hohen Konzentrationen ($50\text{-}100\mu\text{M}$) lösen sich die Zellen sehr schnell von der Unterlage.

6.4.2 Die Effekte von Cytochalasin B und Latrunculin A sind ähnlich

Abbildung 6.8 zeigt eine Zeitserie von Elastizitätsbildern einer Kupferzelle, die 22h nach dem Aussäen mit $0,1\mu\text{M}$ Latrunculin A behandelt wurde. In diesem Experiment wurden Force Maps mit 32×32 Kraftkurven aufgenommen. Dadurch wird zwar die laterale Auflösung reduziert, aber man benötigt nur 5min (statt 20) für die Aufzeichnung einer Force Map.

Die Referenz-Force-Map ist in Abbildung 6.8a zu sehen. Nach Zugabe von Latrunculin A wurden 15 weitere Force Maps aufgenommen, bevor sich die Zelle 100min später vollständig von der Petrischale gelöst hatte. Die ersten 10 Force Maps (Abbildung 6.8b zeigt die letzte davon) zeigen keine deutlichen Veränderungen der Zellelastizität. Danach finden innerhalb von 15min rapide Veränderungen statt (Abbildung 6.8c-e). Im Vergleich zwischen Abbildung 6.8b und Abbildung 6.8c sind bereits deutliche lokale Unterschiede in den berechneten Elastizitätsmoduli zu sehen, die anzeigen, daß Latrunculin A beginnt, die Architektur des Zytoskeletts zu verändern. Allgemein erscheint die Zelle jetzt runder und in der perinuklearen Region deutlich weicher (Pfeile). Auf dem Kern bleiben die Elastizitäten unverändert. Das folgende Elastizitätsbild (Abbildung 6.8d) zeigt ebenfalls ein um den Zellkern ausge-

dehntes weiches Gebiet, aber die Elastizitätsmoduli in der perinuklearen Region sind nun größer. Während der Aufnahme der folgenden Force Map (Abbildung 6.8e) beginnt die Zelle zu zerfallen, vermutlich in Folge der Behandlung mit Latrunculin A. Beobachtungen mit dem optischen Mikroskop bestätigen die Verschiebung des Zellkerns durch die rasternde AFM-Spitze. Nach zwei weiteren Force Maps, die die zunehmende Zerstörung der Zelle zeigen, löst sich die Zelle vom Substrat.

Ein interessantes Ergebnis dieses Experiments war der unterschiedliche Effekt von Latrunculin A in verschiedenen Gebieten der Zelle. Eine deutliche Abnahme der Elastizität wurde nur in der perinuklearen Region beobachtet. Die Elastizitätsmoduli,

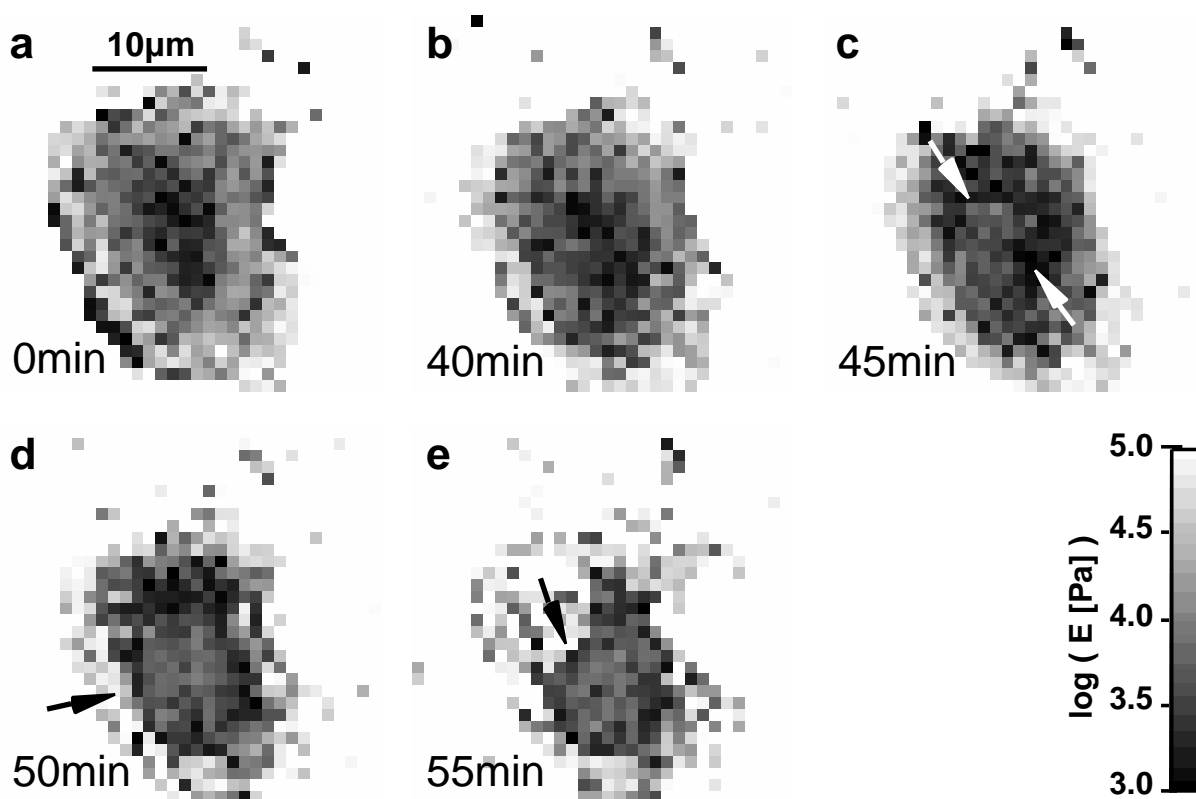


Abbildung 6.8: Zeitserie von Elastizitätsbildern einer lebenden Kupferzelle, aufgenommen während des Abbaus von Aktinfilamenten mit $0,1\mu\text{M}$ Latrunculin A. Die laterale Auflösung wurde auf 32×32 Kraftkurven reduziert, um die zeitliche Auflösung zu verbessern. (a) Referenz. (b) Letztes von neun Elastizitätsbildern, die während der ersten 40min aufgenommen wurden. Deutliche Veränderungen in Zellform und mittlerem Elastizitätsmodul wurden in dieser Zeit nicht beobachtet. Die Verteilung der Elastizitäten veränderte sich dabei ständig, vermutlich aufgrund metabolischer Prozesse. (c-e) Drei aufeinanderfolgende Force Maps, die direkt nach (b) aufgenommen wurden. In (c) erkennt man die beginnende Wirkung der Droge am Weicherwerden der aktinhaltigen perinuklearen Region (Pfeile). Direkt auf dem Kern ist das Aktinnetzwerk weniger stark ausgeprägt, und Elastizitäten könnten deshalb stärker von anderen Bestandteilen des Zytoskeletts oder des Kerns beeinflusst sein. Das scheinbare Härterwerden der Lamellipodien (Pfeil in (d)) ist ein Artefakt, verursacht durch das Abflachen dieser Gebiete als Reaktion auf die Zugabe von Latrunculin A und den deshalb stärker werdenden Einfluß des Substrats auf die gemessenen Elastizitätswerte. In (e) ist auch die perinukleare Region bereits abgeflacht (Pfeil) und die Zelle beginnt, zu zerfallen.

die auf dem Kern gemessen wurden, veränderten sich im Lauf des Experiments nicht. Eine ähnliche Beobachtung, allerdings nicht quantifiziert oder lateral aufgelöst, wurde von Petersen *et al.* [15] an einem 3T3-Fibroblasten gemacht, der mit Cytochalasin B behandelt worden war. Als Erklärung wurde vermutet, daß die Kernelastizität nicht primär durch das Aktinnetzwerk bestimmt wird, sondern daß Kernkomponenten (z. B. die dichte Matrix aus Interphase-Chromatin) oder andere Strukturen, die im kernnahen Gebiet konzentriert sind (z. B. Mikrotubuli oder Intermediärfilamente), einen starken Einfluß auf die elastischen Eigenschaften haben, die auf dem Zellkern gemessen werden.

Wenn diese Erklärung zutrifft, könnte man erwarten, daß bei allen verwendeten Zelltypen für alle verwendeten Wirkstoffe kein Einfluß auf die Kernelastizität gemessen wird. Z. B. bei den Fibroblasten beeinflusste Latrunculin A (wie auch alle anderen Wirkstoffe) die gemessenen Elastizitäten auf dem Kern und in der perinuklearen Region gleichermaßen (Abbildung 6.9). Das ist aber kein Widerspruch, denn ob die gemessenen Kernelastizitäten vom Aktinnetzwerk oder von tiefer gelegenen Strukturen bestimmt sind, hängt von der Eindringtiefe der AFM-Spitze sowie von der Morphologie der individuellen Zelle und des Zelltyps ab. Bei den Fibroblasten wurde mit besonders niedrigen Kräften gearbeitet, so daß die AFM-Spitze z. B. in eine Zelle mit einem Elastizitätsmodul von 10kPa nur etwa 250nm tief eingedrückt wurde. Da bei Fibroblasten im Gegensatz zu Kupferzellen das Aktinnetzwerk besonders stark ausgeprägt ist und zahlreiche stabilisierende Spannungsfasern enthält, ist es nachvollziehbar, daß auf diesen Zellen die elastischen Eigenschaften des sehr dünnen Aktinkortices gemessen wurden, während auf Kupferzellen der oben beschriebene Effekt beobachtet wurde.

Das beobachtete Härterwerden der peripheren Regionen der Zelle (vgl. Abbildung 6.8c und Abbildung 6.8d) ist ein Artefakt. Durch den Abbau des Aktinnetzwerks und das damit verbundene Abflachen und Zurückziehen der Lamellipodien „spürt“ die AFM-Spitze stärker den Einfluß des unter der Zelle befindlichen harten Substrats (vgl. Kapitel 3.3.6).

Bei einem Vergleich der ersten zehn Force Maps dieses Experiments (zwischen Abbildung 6.8a und Abbildung 6.8b) wurden weder Veränderungen in der Zellform noch in der mittleren Elastizität beobachtet. Aufgrund der konvektionslimitierten Wirkstoffverteilung in der Petrischale (siehe Kapitel 6.2) konnte Latrunculin A in die-

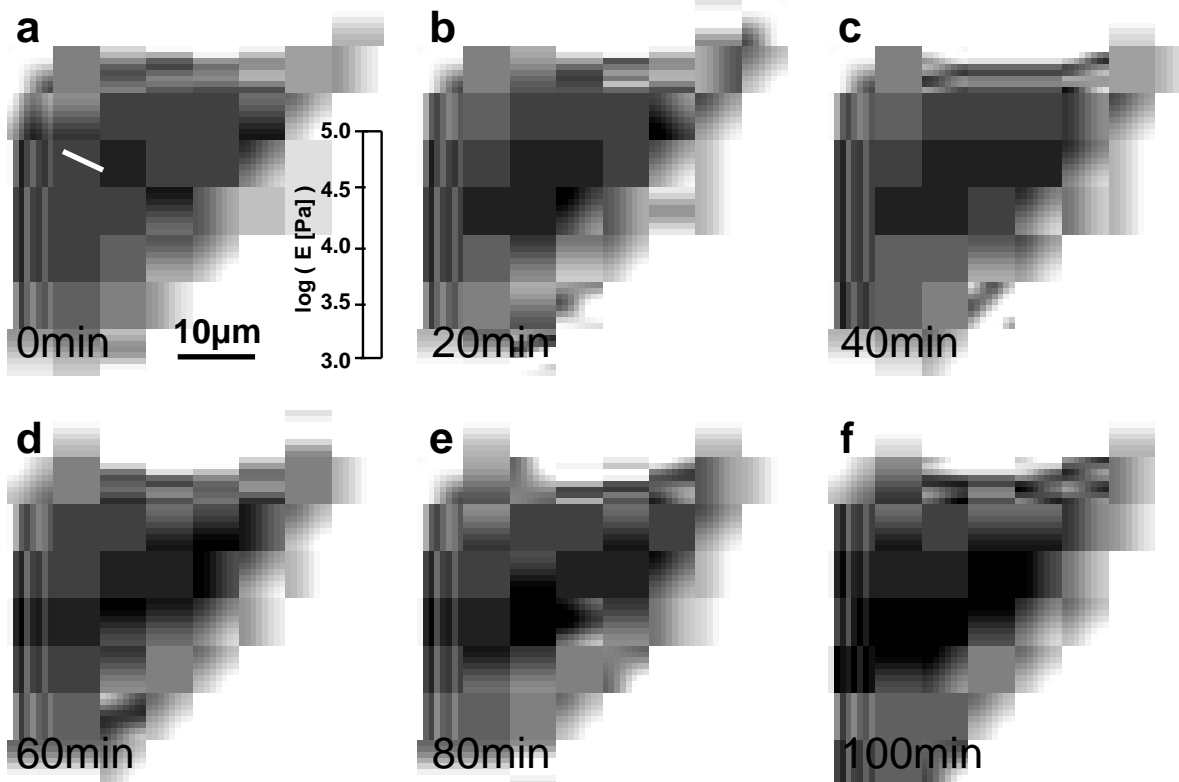


Abbildung 6.9: Zeitserie von Elastizitätsbildern eines lebenden NRK-Fibroblasten, aufgenommen während des Abbaus von Aktinfilamenten mit $0,1\mu\text{M}$ Latrunculin A. (a) Referenz. Der Pfeil zeigt eine Spannungsfaser. (b,c) Geringe Veränderungen in den ersten 40min. (d-f) Allmähliche Abnahme des mittleren Young-Moduls der Zelle. Die Zellform bleibt weitgehend erhalten.

sem Zeitraum das Aktinnetzwerk der Zelle wahrscheinlich noch nicht angreifen. Trotzdem fluktuierte in diesen ersten 40min des Experiments die räumliche Verteilung der lokalen Elastizitätsmoduli (vgl. Abbildung 6.8a und Abbildung 6.8b). Diese Fluktuationen sind vermutlich auf aktive metabolische Prozesse der Zelle wie den Transport von Lysosomen [89] oder Umstrukturierungen im Zytoskelett zurückzuführen. Das zufällige Erscheinungsbild zeigt allerdings, daß die Prozesse auf einer Zeitskala stattfinden, die selbst mit den hier verwendeten „schnellen Force Maps“ (32×32 Kraftkurven in 5min) nicht auflösbar ist. Trotzdem deutet dieses Experiment bereits an, wie Elastizitätsmessungen bei der Untersuchung physiologischer Zellvorgänge eingesetzt werden können. Eine Methode, im Force-Mapping-Modus bessere zeitliche Auflösung zu erzielen, wird im Kapitel 7: Kriechende Zellen vorgestellt.

In Abbildung 6.9 sind Elastizitätsbilder eines NRK-Fibroblasten zu sehen, der mit $0,1\mu\text{M}$ Latrunculin A behandelt wurde. Auch hier wurde vor Zugabe des Wirkstoffs eine Referenz-Force-Map aufgenommen (Abbildung 6.9a). Innerhalb der ersten 40min ist kein deutlicher Einfluß der Droge auf die Elastizität erkennbar (Abbildung

6.9b, c). Danach nimmt der Elastizitätsmodul der Zelle allmählich ab (Abbildung 6.9d-f). Gleichzeitig werden Spannungsfasern zerstört (Pfeil in Abbildung 6.9a).

Wie Abbildung 6.8 und Abbildung 6.9 zeigen, beeinflusst Latrunculin A die Elastizität verschiedener Zelltypen in phänomenologisch ähnlicher Weise wie Cytochalasin B (Abbildung 6.2, Abbildung 6.4, Abbildung 6.5), jedoch bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen von $0,1\mu\text{M}$. Auch für Latrunculin A wurde eine Abnahme des Elastizitätsmoduls der Zellen um den Faktor 2,6 beobachtet (vgl. Abbildung 6.9a, f).

Eine Bündelung der Aktinfilamente zu Spannungsfasern sollte den Tretmühlmechanismus verlangsamen. Deshalb sollte Latrunculin A Spannungsfasern wesentlich langsamer abbauen, als das umgebende Netzwerk einzelner Aktinfilamente - eine Hypothese, die durch die allmähliche Abnahme des Elastizitätsmoduls in Abbildung 6.9 bestätigt wird. Im Unterschied dazu trat die Wirkung von Latrunculin A bei Kupferzellen, die keine Spannungsfasern besitzen, plötzlich ein (Abbildung 6.8).

Konzentrationsabhängigkeiten wurden für Latrunculin A nicht untersucht.

6.4.3 Jasplakinolide greift Spannungsfasern nicht an

Eine Zeitserie von Elastizitätsbildern eines 3T3-Fibroblasten, der mit Jasplakinolide behandelt wurde, ist in Abbildung 6.10 zu sehen. Vor (Abbildung 6.10a, b) und nach (Abbildung 6.10c) den Elastizitätsmessungen wurden AFM-Bilder der Zelle aufgenommen. Unter Einfluß von Jasplakinolide zieht die Zelle das anfangs ausgestreckte Lamellipodium (Pfeilköpfe in Abbildung 6.10b) fast vollständig zurück (Pfeilköpfe in Abbildung 6.10c). Nach dem Experiment weist die Zelle nur noch größtenteils konkave Zellränder auf, ein Hinweis darauf, daß sie nicht mehr aktiv kriecht. Um die diffusionsbedingte Verzögerung der Wirkung der Droge zu verkürzen, wurde das gesamte Medium nach Aufnahme der Referenz-Force-Map gegen frisches Medium ausgetauscht, das bereits $0,1\mu\text{M}$ Jasplakinolide enthielt. Trotzdem sind innerhalb der ersten 40min noch keine Auswirkungen auf die Zellelastizität zu beobachten (Abbildung 6.10e, f). Danach beginnt die Zelle, aktive Regionen zurückzuziehen (Abbildung 6.10g-l), und der mittlere Elastizitätsmodul nimmt allmählich um einen Faktor 2,4 ab. Durch die Behandlung mit Jasplakinolide wurde also das Aktinnetzwerk zerstört. Im Unterschied zu den Cytochalasinen und Latrunculin A werden aber Spannungsfasern nicht angegriffen und sind nach dreistündiger Einwirkung von Jasplakinolide immer noch vorhanden (Abbildung 6.10c).

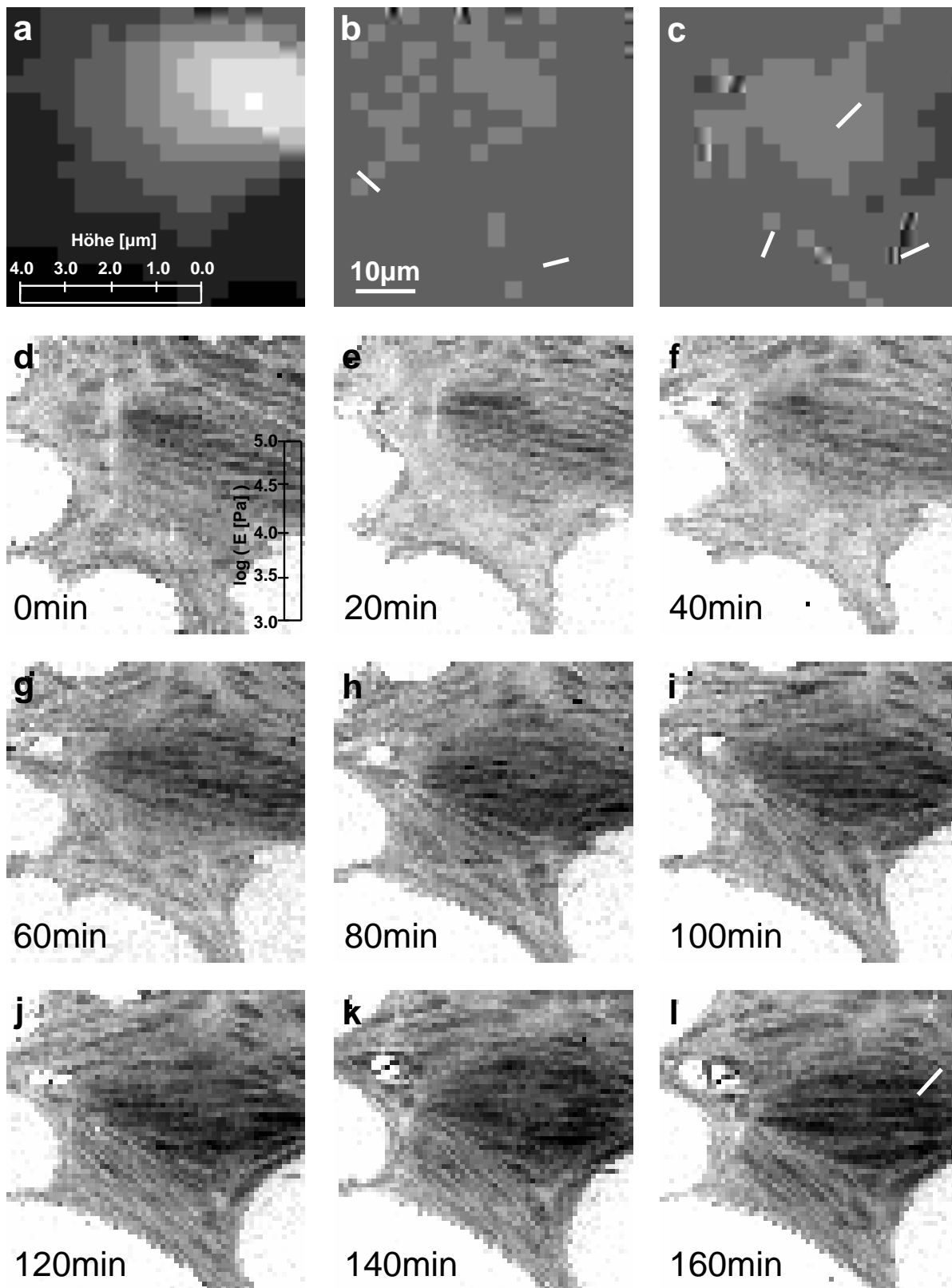


Abbildung 6.10: Zeitserie von Elastizitätsbildern eines 3T3-Fibroblasten, aufgenommen während des Abbaus von Aktinfilamenten mit $0,1\mu\text{M}$ Jasplakinolide. AFM-Bilder vor (a (Höhe), b (Auslenkung)) bzw. nach dem Experiment (c (Auslenkung)) zeigen, daß aus aktiven Lamellipodien stabile Regionen geworden sind (Pfeilköpfe in (b,c)). (d) Referenzelastizitätsbild. (e,f) Kaum Veränderungen in den ersten 40min. (g) Aktive Regionen beginnen, sich zurückzuziehen. (h-l) Allmähliche Abnahme des mittleren Elastizitätsmoduls und weiteres Zurückziehen aktiver Regionen. Nach 3h sind immer noch Spannungsfasern vorhanden (Pfeile in (c) und (l)).

In den bisher gezeigten Experimenten führte die Behandlung mit Cytochalasin B und D oder Latrunculin A zunächst nur zu einem Weicherwerden der Zelle in Gebieten, in denen keine Spannungsfasern vorhanden waren. Während der Zusammenhalt des Netzwerks quervernetzter einzelner Aktinfilamente bereits beeinträchtigt ist, scheinen Filamentbündel, also Spannungsfasern noch nicht von den Wirkstoffen angegriffen zu werden (Abbildung 6.1c, Abbildung 6.4d, Abbildung 6.6e, Abbildung 6.7c und Abbildung 6.9d). Ein geringerer Umsatz von Aktinmonomeren in gebündelten Filamenten erklärt die Verzögerung der Wirkung der Substanzen auf Spannungsfasern. Die Cytochalasine und Latrunculin A verschieben das Gleichgewicht zwischen Aktinfilamenten und Monomeren, indem sie die Plus-Enden der Filamente cappen (siehe Kapitel 2.3) [116] bzw. Aktinmonomere binden [102]. Während diese Substanzen aber auch in der Lage sind, Spannungsfasern abzubauen (Abbildung 2.1g, Abbildung 6.4g, Abbildung 6.6g, Abbildung 6.7d und Abbildung 6.9e), scheint Jasplakinolide Spannungsfasern nicht anzugreifen (vgl. Abbildung 6.10b und c). Das deutet auf einen grundlegenden Unterschied im Wirkungsmechanismus dieser Droge hin. Mögliche Mechanismen, die im Einklang mit der Unempfindlichkeit von Spannungsfasern gegen Jasplakinolide stehen, sind z. B. die Auflösung der Quervernetzungen zwischen den Aktinfilamenten oder das Durchtrennen einzelner Filamente.

Spannungsfasern vermitteln über Fokalkontakte die feste Verbindung der Zellen zur umgebenden extrazellulären Matrix. Daher erklärt die Tatsache, daß Jasplakinolide die Spannungsfasern von Fibroblasten nicht abbaut, die beständige feste Adhäsion der Zellen an die Petrischale bei Behandlung mit höheren Konzentrationen der Droge im Gegensatz zum schnellen Ablösen der Zellen bei Behandlung mit hohen Cytochalasin-Konzentrationen.

In anderen Zelltypen wie z. B. Leberendothelzellen greift Jasplakinolide allerdings auch Spannungsfasern an [111].

6.4.4 Phalloidin gelangt nicht durch die Zellmembran

Eine Behandlung von Zellen beider Fibroblastenzelllinien mit bis zu 500µM Phalloidin hatte keinen Einfluß auf die Zellelastizität (Daten nicht gezeigt). Phalloidin ist ein relativ großes Molekül (789g/mol) und deshalb nicht in der Lage, durch die intakte Membran in die Zelle zu gelangen. Für die Fluoreszenzfärbung muß die Membran deshalb vor der Zugabe des Farbstoffs mit Hilfe von Detergenzien permeabilisiert

werden. Die Permeabilisierung beeinflusst aber wahrscheinlich die Zellelastizität. Deshalb wurde in den Experimenten kein Detergens verwendet, so daß das Ergebnis lediglich als Kontrollexperiment angesehen werden kann: Phalloidin gelangt nicht durch die Zellmembran und die Elastizität der Zelle bleibt unverändert.

Darauf aufbauend könnte allerdings ein zusätzliches Experiment durchgeführt werden. Durch die Verwendung einer sehr scharfen AFM-Spitze würde die Zellmembran verletzt werden [76]. Somit hätte Phalloidin die Möglichkeit, in die Zelle zu gelangen und die Wirkung auf die Zellelastizität könnte simultan gemessen werden, um die Frage zu klären, ob die chemische Stabilisierung der Aktinfilamente eine mechanische Stabilisierung mit sich bringt.

6.5 Konzentrationsabhängigkeit und zeitlicher Verlauf

Konzentrationsabhängigkeiten wurden für die Cytochalasine und Jasplakinolide ausführlich getestet. Allgemein wurde ein schnelleres Eintreten des Drogeneffekts bei höheren Konzentrationen beobachtet, aber nur geringe Unterschiede im Umfang der Elastizitätsabnahme. Letzteres ist nur der Fall, wenn die Zellen während des Experiments vollständig am Substrat adhäriert bleiben. Ansonsten behindern im Medium treibende Teile der Lamellipodien die Messungen, und man erhält verzerrte Kraftkurven. Es scheint Konzentrationsschwellen von 2-4 μ M für Cytochalasin B, 1-2 μ M für Cytochalasin D und 0,01 μ M für Jasplakinolide zu geben, unterhalb derer die Substanzen keinen Einfluß auf die Zellelastizitäten haben. Für einen gegebenen Wirkstoff bei einer gegebenen Konzentration variiert die Zeit zwischen Zugabe und Effekt unregelmäßig (20-120min), selbst wenn für eine bessere Verteilung des Wirkstoffs gesorgt wurde (siehe Anhang A.2). Die Konvektionslimitierung kann allerdings auch bei Austausch des Mediums Bestand haben, weil nicht zu verhindern ist, daß zwischen Fluidzelle und Petrischale ein Meniskus mit wirkstofffreiem Medium verbleibt. Die Zeitkonstanten für Diffusion (80min) und Konvektion (5-10min) wurden bereits in Kapitel 6.2 abgeschätzt.

Die Behandlung mit Cytochalasin B oder D hatte eine 2,9- bzw. 3,0-fache Abnahme des mittleren Elastizitätsmoduls der Zelle zur Folge (Mittelwert aus je 5 Experimenten), Zugabe von Latrunculin A nur eine 2,6-fache (2 Experimente) und von Jasplakinolide eine 2,5-fache Abnahme (3 Experimente). Für einen gegebenen Wirkstoff mit einer gegebenen Konzentration variierte der Umfang der Elastizitätsabnahme aller-

dings deutlich zwischen den individuellen Experimenten ohne erkennbare Abhängigkeit von Zelltyp oder -region. Deshalb könnte nur mit einer wesentlich größeren Anzahl von Experimenten geklärt werden, ob die geringen Unterschiede zwischen den Effekten der Cytochalasine bzw. Latrunculin A und Jasplakinolide signifikant sind.

6.6 Mikrotubuli beeinflussen die Zellstabilität kaum

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Experimenten wurden keine Veränderungen des Elastizitätsmoduls lebender Zellen gemessen, nachdem diese mit Substanzen behandelt worden waren, die den Zusammenhalt des Mikrotubuli-Netzwerks beeinflussen. Abbildung 6.11 zeigt einen repräsentativen Datensatz, der während der Behandlung eines NRK-Fibroblasten mit 100µM Colchicin aufgenommen wurde. Nach 60-minütiger Einwirkung (Abbildung 6.11b) zeigt der Wirkstoff im Vergleich zum Referenzelastizitätsbild (Abbildung 6.11a) noch keinen Einfluß auf die Zellelastizität. Die Zelle behält ihre Form und Spannungsfasern (Pfeil in Abbildung 6.11a) werden nicht angegriffen. In weiteren Experimenten wurden keine Effekte gemessen, wenn Zellen 2h lang mit bis zu 500µM Colchicin oder Colcemid bzw. bis zu 100µM Taxol behandelt wurden, selbst wenn das Medium vollständig durch eine Lösung mit dem Wirkstoff ersetzt wurde.

Insbesondere ist es erstaunlich, daß der Abbau von Mikrotubuli, der von Colchicin und Colcemid in ähnlicher Weise bewirkt wird, wie der Abbau von Aktinfilamenten durch die Cytochalasine, nicht zum Weicherwerden der Zellen führt. Eine Erklärung ergibt sich aus der Morphologie des Mikrotubuli-Netzwerks. Mikrotubuli sind polare

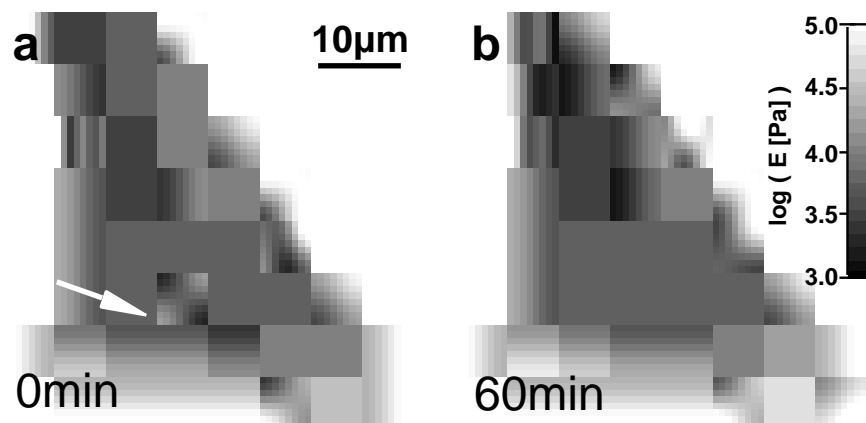


Abbildung 6.11: Zeitserie von Elastizitätsbildern eines lebenden 3T3-Fibroblasten, aufgenommen während des Abbaus von Mikrotubuli mit 100µM Colchicin. (a) Referenz. (b) Keine Änderung der Zellelastizität nach 60min.

Strukturen, deren langsamer wachsendes Minus-Ende im Zentrosom, einer kernnahen Organelle eingebettet ist. Das Plus-Ende zeigt von dort zur Zellperipherie. Im Gegensatz zu Spannungsfasern verlaufen Mikrotubuli deshalb sternförmig von der Zellmitte weg und nicht entlang der Zellmembran, so daß sie diese nicht unterstützen können. Die höchste Dichte der Mikrotubuli findet man in der perinuklearen Region der Zelle, so daß die Eindringtiefe der AFM-Spitze offenbar nicht ausreicht, um einen Einfluß der Mikrotubuli auf die gemessenen elastischen Eigenschaften der Zelle zu „spüren“.

Man kann allerdings erwarten, daß Mikrotubuli einen stärkeren Einfluß auf die Elastizität in anderen Zellen oder unter anderen Bedingungen ausüben (z. B. in Axonen oder während der Mitose).

6.7 Langzeitexperimente sind möglich

Die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente sind Langzeitmessungen an lebenden Zellen mit dem AFM. Der Versuchsaufbau (Kapitel 3.2) ermöglicht es, während der Versuche für die Zellen optimale Umgebungsbedingungen von 37°C und 5% CO₂ in der Atmosphäre aufrechtzuerhalten. Durch die Beschränkung auf stumpfe AFM-Spitzen (Öffnungswinkel 35°) und niedrige Auflagekräfte (<1nN) wird sichergestellt, daß die Spitze die Zellmembran nicht durchdringt [76]. So wurden Zellen trotz kontinuierlichen Force Mappings und unter dem Einfluß zytotoxischer Wirkstoffe für mehr als 3h am Leben gehalten. Selbst Abbilden mit dem AFM war über längere Zeiträume möglich (Abbildung 6.1), obwohl dabei zusätzlich laterale Kräfte auf die Zelle ausgeübt werden.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit einem Trypan-Blau-Test nachgewiesen, kann aber auch aus dem fortgesetzten Ablauf metabolischer Prozesse (z. B. Kriechen) oder beständiger Adhäsion an die Unterlage geschlußfolgert werden. In Kontrollexperimenten, bei denen die Zellen nicht mit Wirkstoffen behandelt wurden bzw. nur mit DMSO, das als Lösungsmittel für die Wirkstoffe verwendet wird (siehe Anhang A.2), ergaben sich keine Auswirkungen auf die berechneten Elastizitätsmoduli. Auch die Ähnlichkeit aufeinanderfolgender Elastizitätsbilder am Anfang der Experimente zeigt, daß die später beobachteten Veränderungen in Morphologie und lokaler Elastizität nicht auf die Untersuchung mit dem AFM zurückzuführen sind.

6.8 Zusammenfassung

Verschiedene Substanzen, die das Aktin- oder das Mikrotubuli-Netzwerk stabilisieren bzw. abbauen, wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Elastizität lebender Zellen untersucht. Allgemein führte der Abbau des Aktinnetzwerks zu einem Verlust mechanischer Stabilität, wohingegen Substanzen, die Mikrotubuli angreifen oder stabilisieren, keinen Einfluß auf die Zellelastizität hatten. Daraus kann man schlußfolgern, daß das Aktinnetzwerk die elastischen Eigenschaften lebender Zellen bestimmt.

Einen Überblick über die gemessenen Effekte gibt Tabelle 6.1. Bei Konzentrationen

	Wirkung	Konzentration	Elastizitäts- abnahme	Verzögerung des Effekts	Wirkung auf Spannungs- fasern
Cytochalasin B	Abbau von F-Aktin	<4µM 5-20µM >50µM	keine 2,9-fach n.a.*	- 20-120 min « 20 min	keine Abbau Abbau
Cytochalasin D	Abbau von f- Aktin	<2µM 5-30µM >50µM	keine 3-fach n.a.*	- 20-100 min « 20 min	keine Abbau Abbau
Latrunculin A	Abbau von f- Aktin	0,1µM	2,6-fach	40-80 min	Abbau
Jasplakinolide	abhängig von Zelltyp und Konzentration	<0,01µM 0,05-0,5µM 1-10µM	keine 2,5-fach (6-fach)	- 40-120 min « 20 min	keine keine keine
Colchicin, Colcemid	Abbau von Mikrotubuli	500µM	keine	-	keine
Taxol	stabilisiert Mikrotubuli	100µM	keine	-	keine

Tabelle 6.1: Überblick über die gemessenen Effekte der verschiedenen Wirkstoffe. Die Werte für die Abnahme des mittleren Elastizitätsmoduls sind Mittelwerte über zahlreiche Experimente und weichen deshalb z. T. von den Werten ab, die im Text für die in den Abbildungen gezeigten Experimente angegeben sind. (* Zellen lösten sich während der Aufnahme der ersten Force Map nach Drogezugabe vom Substrat)

der Cytochalasine von 10 μ M bzw. von 0,1 μ M Latrunculin A oder Jasplakinolide wurde jeweils eine Abnahme des mittleren Elastizitätsmoduls der Zelle um etwa einen Faktor 3 gemessen. Obwohl Konzentrationsabhängigkeiten nicht quantifiziert werden konnten, wirkten alle verwendeten Substanzen bei höheren Konzentrationen deutlich schneller. Für die Wirkstoffe, die Aktinfilamente angreifen, wurden verschiedene Wirkungsmechanismen beobachtet. Im Unterschied zu den anderen Substanzen greift Jasplakinolide Spannungsfasern nicht an. Durch die Behandlung mit Cytochalasin D bilden sich im Zytosol der Zellen aus kurzen Aktinfilamenten filzartige Aggregate.

Der Mechanismus, der es lebenden Zellen ermöglicht zu kriechen, wurde noch nicht in allen Details aufgeklärt, man vermutet jedoch, daß dynamische Umstrukturierungen des Aktinnetzwerks eine entscheidende Rolle spielen [41,43]. Mit den in diesem Kapitel vorgestellten Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Aktinfilamente und ihr Polymerisationszustand einen entscheidenden Einfluß auf die Elastizität von Zellen haben. Deshalb können mit Hilfe von Elastizitätsmessungen an lebenden Zellen neue Erkenntnisse über den Mechanismus der Zellwanderung gewonnen werden.

7. Kriechende Zellen

Das Kriechen lebender Zellen umfaßt eine komplexe Gruppe integrierter molekularer Ereignisse, die für eine Vielzahl biologischer Prozesse von essentieller Bedeutung sind. In letzter Zeit wurden beträchtliche Fortschritte im Verständnis verschiedener molekularer Mechanismen erzielt, die bei der Zellwanderung eine Rolle spielen [117,118]. Weniger ist über die physikalischen Eigenschaften kriechender Zellen bekannt, insbesondere über die mechanische Beschaffenheit der Zelloberfläche und die Kräfte, die das Kriechen ermöglichen [119,120]. Lokale Messungen der Elastizität und der Eigenschaften aktiver Bereiche wurden bereits mit dem „Cell Poker“ [15] und mit feinen Nadeln [121] durchgeführt. Auch optische Pinzetten wurden schon eingesetzt, um z. B. auf aktiven und stabilen Regionen lebender Fibroblasten die Verbindung zwischen Oberflächenintegrinen und dem membranassoziierten Zytoskelett zu untersuchen [122,123]. Solche Verbindungen wurden auch mit Hilfe magnetischer Methoden untersucht [124]. Fortschritte in der Silikonsubstrattechnologie ermöglichten die Messung von Traktionskräften, die schnell kriechende Fisch-Keratocyten [42,125,126] bzw. sich teilende Zellen [127] auf das Substrat ausüben. Traktionskräfte kriechender Fibroblasten konnten mit Hilfe von Siliziumcantilevern gemessen werden, die in ein Silikonsubstrat eingebettet waren [128]. Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit deformierbaren Polyacrylamid-Substraten durchgeführt [129].

Abbildung 7.1 zeigt AFM-Auslenkungsbilder einer kriechenden Kupferzelle, die verschiedene, häufig beobachtete Teilvorgänge der Zellwanderung veranschaulichen. Die Schatten in den Bildern sind darauf zurückzuführen, daß die Nachregelung (siehe Kapitel 3.1.2) die starken Höhenunterschiede der Probe nicht völlig kompensieren konnte und hätten durch langsamere Rastergeschwindigkeit auf Kosten der zeitlichen Auflösung vermieden werden können. In Abbildung 7.1a, aufgenommen etwa 50min nach dem Aussäen der Zellen, scheint die untersuchte Zelle noch nicht vollständig ausgebreitet zu sein. Am unteren Rand streckt sie zahlreiche Filopodien aus (Pfeil), die während der beiden folgenden Aufnahmen (nicht gezeigt) zu einem flachen Lamellipodium verschmelzen (Abbildung 7.1b). Gleichzeitig wird das Lamellipodium am oberen Bildrand zurückgezogen und verdickt sich von 0,8 auf 2µm (gemessen in den gleichzeitig aufgenommenen Höhenbildern - hier nicht gezeigt). Während der folgenden sechs Aufnahmen zieht die Zelle alle Lamellipodien weitgehend

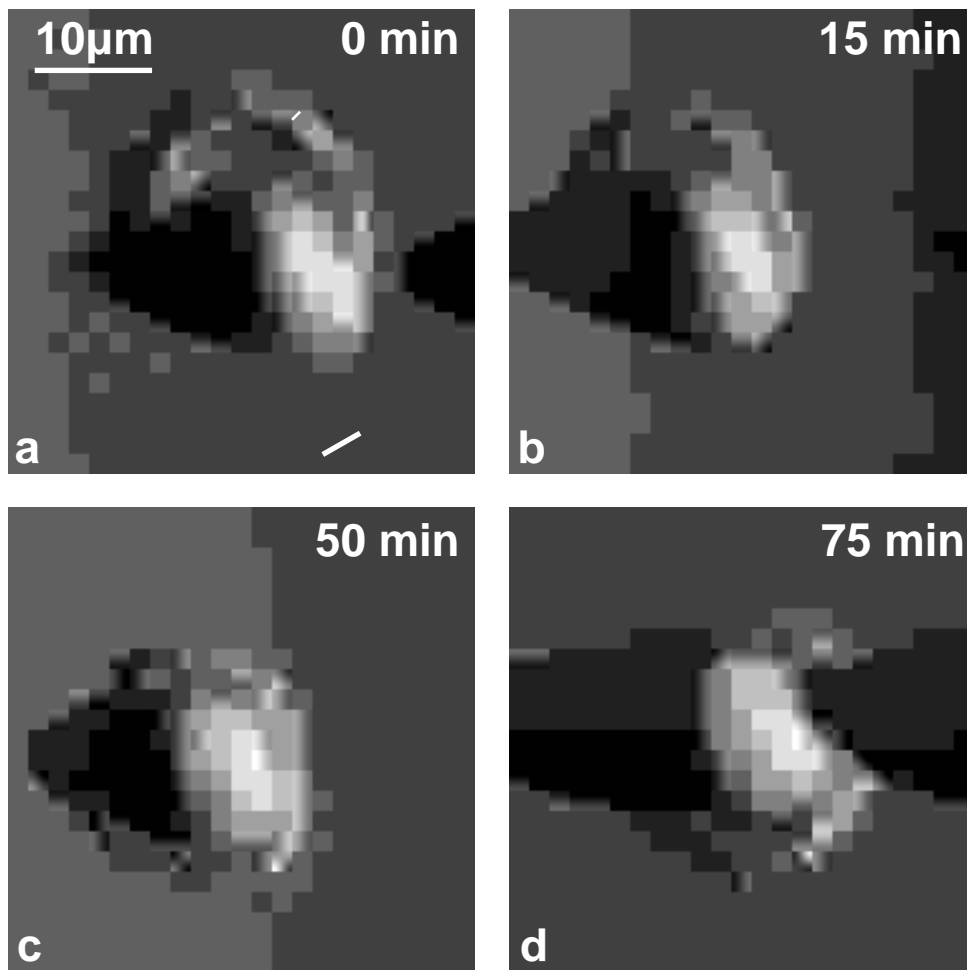


Abbildung 7.1: Zeitserie von Auslenkungsbildern einer kriechenden Kupferzelle 50min nach dem Aussäen. (a-c) Bild 1, 4 bzw. 10 einer kontinuierlichen Serie. Zwischen (c) und (d) wurde eine Force Map aufgenommen. (a) Lamellipodium (Pfeilkopf) und Filopodien (Pfeil) werden ausgestreckt. (b) Nach 15min hat sich das obere Lamellipodium zurückgezogen. Die Filopodien sind zu einem neuen flachen Lamellipodium verschmolzen. (c) Nach sechs weiteren Bildern (nicht gezeigt) rundet sich die Zelle und zieht alle Lamellipodien zurück, beginnt aber 20min später wieder sich auszubreiten (d).

zurück und rundet sich (Abbildung 7.1c). Nach der Aufnahme einer Force Map (Dauer: etwa 20min) erscheint die Zelle wieder deutlich weiter ausgebreitet.

In diesem Kapitel wird demonstriert, wie der Force-Mapping-Modus eingesetzt werden kann, um das Ausstrecken aktiver Zellbereiche hinsichtlich Kinetik, Topographie und mechanischer Eigenschaften zu untersuchen. Der Elastizitätsmodul der Zellen dient dabei als Maß für die sogenannte *kortikale Steifheit* der Zellen. Eine höhere kortikale Steifheit ist entweder auf ein intrinsisch härteres Zytoskelett und/oder auf erhöhte Zugspannung im Kortex der Zelle zurückzuführen. Die gemessenen mechanischen Eigenschaften aktiver Regionen werden mit den Ergebnissen analoger Messungen an stabilen Regionen verglichen und bezüglich aktueller Modelle für das Kriechen lebender Zellen diskutiert.

7.1 Fibroblasten

7.1.1 Durchführung der Messungen

Der in Kapitel 3.2 beschriebene Versuchsaufbau erlaubt es, die Umgebungsbedingungen so zu gestalten, daß lebende Zellen über längere Zeiträume hinweg Bewegungsvorgänge aufrechterhalten können, während mit dem AFM die mechanischen Eigenschaften der Zellen untersucht werden.

Die Untersuchungen der Bewegungsvorgänge wurden an 3T3-Fibroblasten durchgeführt, die mikroskopischen Beobachtungen zufolge aktiver, d. h. kriechfreudiger als NRK-Fibroblasten sind. Bestätigt wird dieser subjektive Eindruck dadurch, daß Spannungsfasern bei 3T3-Fibroblasten im Vergleich zu NRK-Fibroblasten deutlich schwächer ausgeprägt ist.

Abbildung 7.2 zeigt ein Auslenkungsbild eines kriechenden 3T3-Fibroblasten. Aktive und stabile Regionen, wie sie im folgenden untersucht werden sollen, sind in der Abbildung durch einen Kreis bzw. ein Quadrat gekennzeichnet. Da die Aufnahme einer einzelnen Force Map mit einer Auflösung von 64×64 Kraftkurven etwa 20min dauert, ist normales Force Mapping ungeeignet, schnelle Vorgänge wie das Aus-

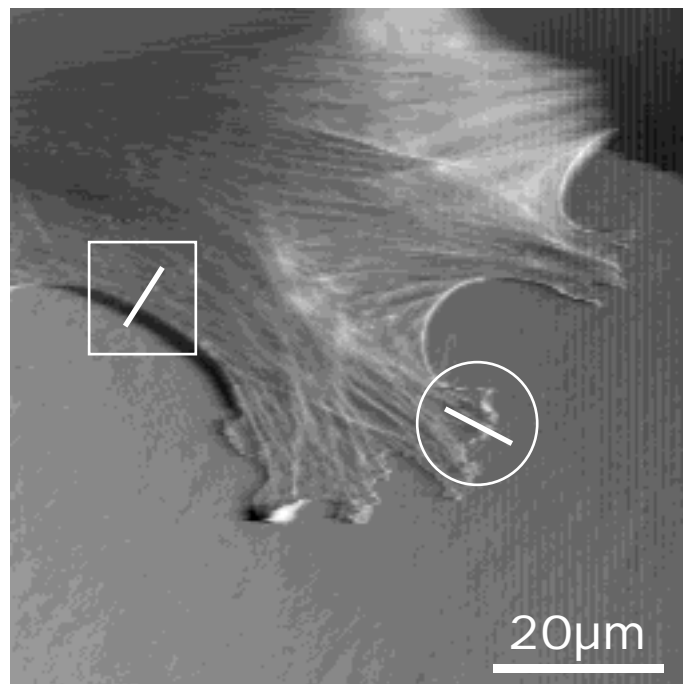


Abbildung 7.2: AFM-Auslenkungsbild eines 3T3-Fibroblasten. Für aktive Lamellipodien (Kreis) und stabile Bereiche (Quadrat) sind mögliche Rasterlinien zur Untersuchung der jeweiligen Region angegeben.

strecken von Lamellipodien zu untersuchen. Deshalb mußte auf die zweidimensionale Auflösung verzichtet werden, und das AFM wurde im sogenannten „y-disable“-Modus betrieben. Dabei werden kontinuierlich Kraftkurven entlang einer festen Linie aufgenommen. Beispiele für mögliche Linien sind in Abbildung 7.2 für beide Regionen schematisch dargestellt. Die Auswertung der Kraftkurven (Kapitel 3.3.4) liefert Zeitserien von Höhen- und Elastizitätsprofilen entlang der untersuchten Linien.

7.1.2 Kinetik der Bewegung des Zellrands

Die so erhaltenen Höhen- und Elastizitätsprofile wurden wie üblich als Grauwerte codiert und zeilenweise zu je einer Bilddatei zusammengefaßt. Die entstandenen

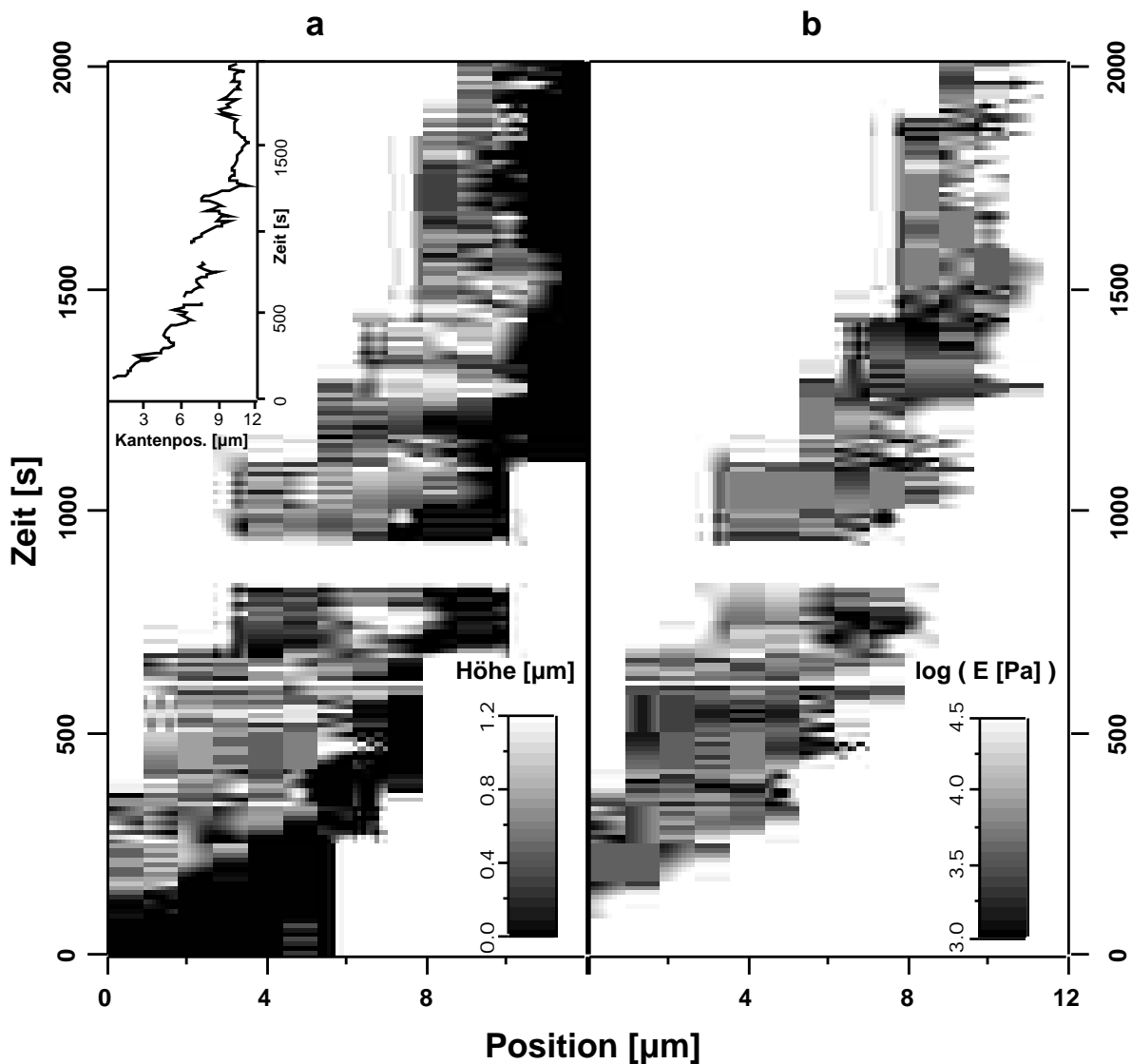


Abbildung 7.3: Aufeinanderfolgend aufgenommene Zeilen von Kraftkurven entlang einer festen Linie senkrecht zum Rand des aktiven Lamellipodiums eines kriechenden 3T3-Fibroblasten, hinsichtlich realer Höhe (a) und Elastizitätsmodul (b) ausgewertet und gegen die Zeit (vertikale Achse) aufgetragen. Das kleine Diagramm in (a) zeigt Position vs. Zeit für den Zellrand. Überlagert von Fluktuationen der Randposition wird das Lamellipodium ausgestreckt.

Bilder zeigen Höhen- und Elastizitätsverlauf entlang der untersuchten Linie (horizontale Achse) im Zeitverlauf (vertikale Achse).

In Abbildung 7.3 ist ein Datensatz zu sehen, der auf einer aktiven Region aufgenommen wurde. Abbildung 7.3a zeigt das Höhenprofil im Zeitverlauf. Sowohl die Höhe als auch die Position des Zellrands fluktuieren stark. Über einen Zeitraum von mehr als 30min streckt sich die aktive Region um etwa $10\mu\text{m}$ aus. Dieser Netto-Vorwärtsbewegung sind die Fluktuationen der Randposition überlagert.

Das Ergebnis eines analogen Experiments, in dem eine stabile Region eines 3T3-Fibroblasten untersucht wurde, ist in Abbildung 7.4 dargestellt. Der Begriff „stabil“ stellt die in diesem Zusammenhang gebräuchliche Bezeichnung für Bereiche der

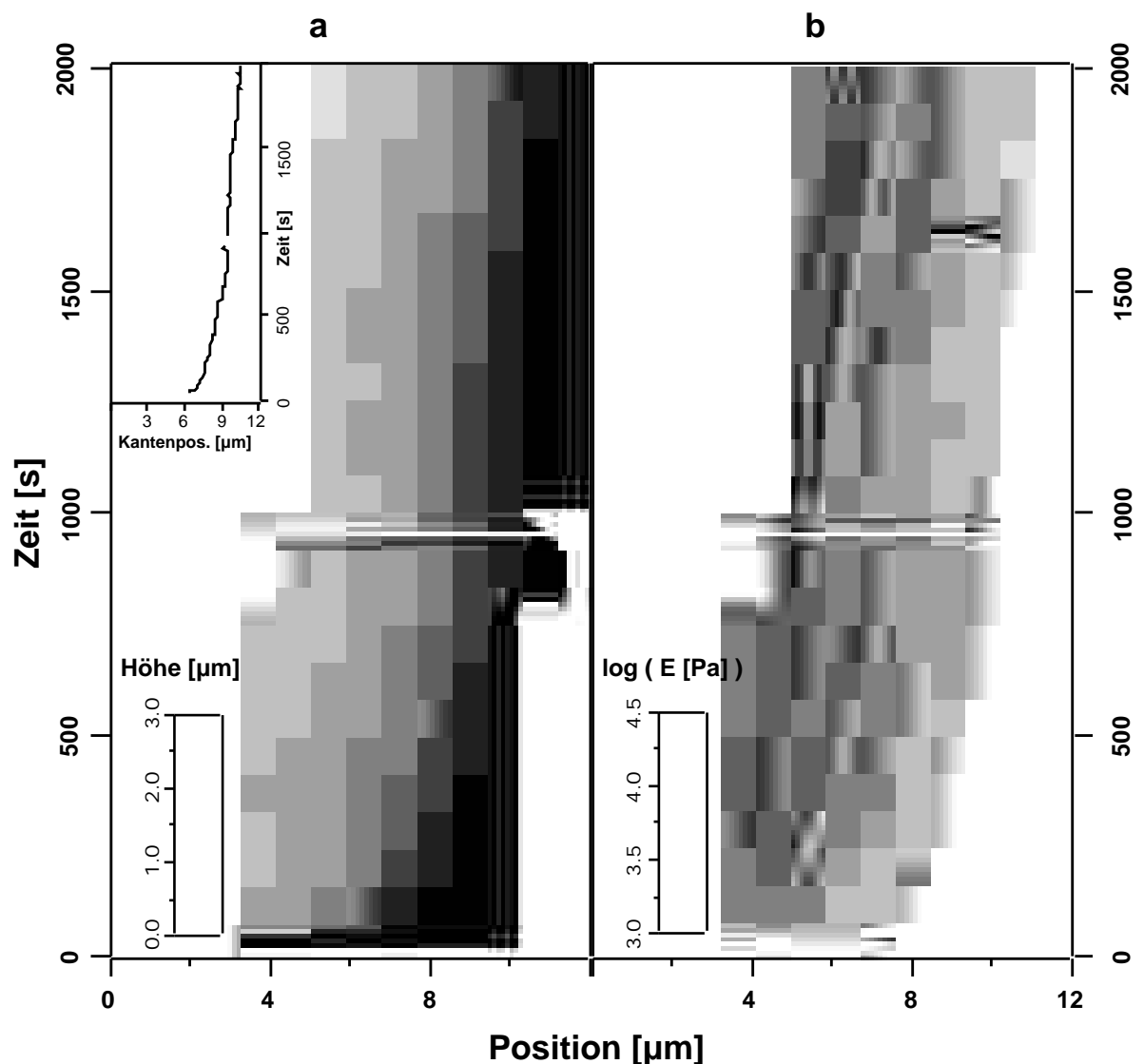


Abbildung 7.4: Aufeinanderfolgend aufgenommene Zeilen von Kraftkurven entlang einer festen Linie senkrecht zum Rand der stabilen Region eines kriechenden 3T3-Fibroblasten, hinsichtlich realer Höhe (a) und Elastizitätsmodul (b) ausgewertet und gegen die Zeit (vertikale Achse) aufgetragen. Das kleine Diagramm in (a) zeigt Position vs. Zeit für den Zellrand. Die Bandstruktur in (b) ist auf senkrecht zur Rasterlinie verlaufende Spannungsfasern zurückzuführen.

Zelle dar, die sich nicht aktiv bewegen, sondern passiv bleiben und dabei auch langsam nach außen geschoben werden können. So wird z. B. der Zellrand der untersuchten Region während der 2000s des Experiments um etwa $4\mu\text{m}$ verschoben. Im Elastizitätsprofil treten lokale Maxima auf, die relativ zum Rand der Zelle nahezu ortsfest bleiben und daher in Abbildung 7.4b als senkrechte Streifen sichtbar werden. Diese Elastizitätsmaxima sind auf Spannungsfasern zurückzuführen, die parallel zum Zellrand verlaufen und damit die untersuchte Linie senkrecht schneiden.

Durch sogenanntes Thresholding der Elastizitätsmoduli (Abbildung 7.3b und Abbildung 7.4b) wurde für den aktiven und den stabilen Bereich in jeder Zeile die Position des Zellrands ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen (kleine Diagramme). Auf diese Weise konnte das dynamische Verhalten aktiver und stabiler Bereiche mit der Frequenz des Linienrasterns ($0,1\text{Hz}$) untersucht werden. Die Diagramme zeigen ein wesentlich dynamischeres Verhalten des aktiven Bereichs, das sich in Fluktuationen der Randposition äußert.

Durch Differentiation dieser Graphen kann die momentane Geschwindigkeit der jeweiligen Region berechnet werden. Für jede Zeile wurde dazu der Differentialquotient aus der Randposition der jeweils nächsten und der vorigen Zeile gebildet. Daher ergibt sich die minimale noch auflösbare Geschwindigkeit ($5,2\text{nm/s}$), wenn sich der Zellrand um 1 Pixel (110nm) bewegt, während zwei Zeilen von Kraftkurven aufgenommen werden (21s). Die mittleren Geschwindigkeiten können mit größerer Genauigkeit berechnet werden ($0,055\text{nm/s}$ entspr. 1 Pixel in 2000s).

Die Verteilung der momentanen Geschwindigkeiten des Zellrandes im aktiven (a) und stabilen (b) Bereich ist in Abbildung 7.5 dargestellt. Die mittlere Geschwindigkeit

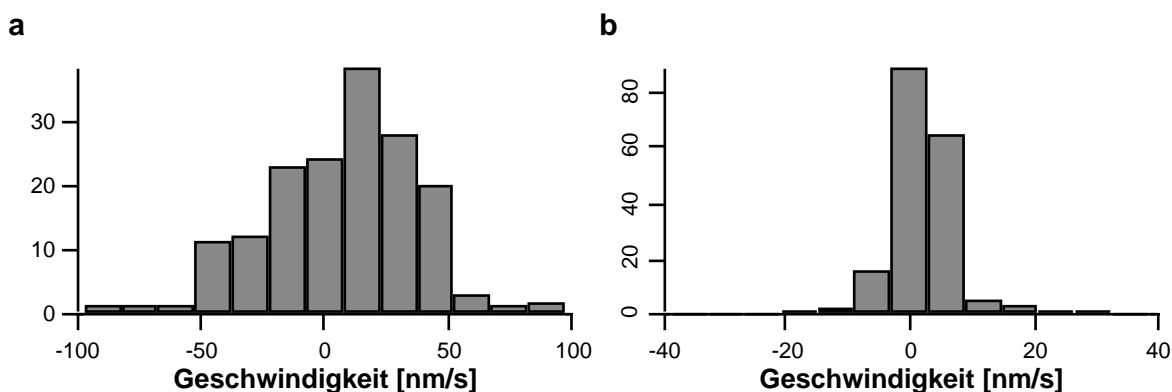


Abbildung 7.5: Histogramme der momentanen Geschwindigkeiten des Zellrandes der aktiven (a) und der stabilen (b) Region.

des aktiven Lamellipodiums beträgt 5,5nm/s und setzt sich aus Phasen des Ausstreckens und des Zurückziehens zusammen. Da das Ausstrecken überwiegt, bewegt sich der Rand der Zelle im Mittel nach außen. Für beide Phasen werden Maximalgeschwindigkeiten von etwa 50nm/s gemessen. Der Rand der stabilen Region fluktuiert kaum, sondern verschiebt sich langsam mit einer mittleren Geschwindigkeit von 1,9nm/s nach außen. Dabei liegen 93% der gemessenen einzelnen Geschwindigkeitswerte im Bereich der Nachweisgrenze von $\pm 5,2$ nm/s (siehe oben) oder darunter.

Obwohl Fibroblasten oft nur mit mittleren Geschwindigkeiten kriechen, die deutlich unter 15nm/s liegen, ist bekannt, daß sich aktive Lamellipodien sehr dynamisch verhalten können und häufig mit Geschwindigkeiten ausgestreckt werden, die den mittleren Wert um ein Vielfaches übersteigen. Literaturwerte für Kriechgeschwindigkeiten bestimmter Zelltypen weichen oft beträchtlich voneinander ab. Allerdings stimmt der hier gemessene Wert von 5,5nm/s nahezu exakt mit dem von Theriot und Mitchison gemessenen Wert von 5,0nm/s für 3T3-Fibroblasten am Rand einer konfluenten Zellschicht überein [130]. Unter Berücksichtigung von Unterschieden im Zelltyp sind die hier vorgestellten Messungen auch in genereller Übereinstimmung mit Literaturwerten, die für verschiedene Fibroblastentypen maximale Ausstreckgeschwindigkeiten bis zu 80nm/s angeben [121,131]. Auf dem aktiven Lamellipodium sind zahlreiche kurze Phasen des Zurückziehens einem allgemeinen Ausstrecken überlagert. Fluktuationen des Zellrands und die Ähnlichkeit der maximalen Geschwindigkeiten für Phasen des Ausstreckens und des Zurückziehens wurden bereits von Abercrombie *et al.* beobachtet [131]. Auch in diesen Experimenten führte nur die größere Häufigkeit des Ausstreckens zur Vorwärtsbewegung.

Die Übereinstimmungen der Ergebnisse der hier vorgestellten AFM-Untersuchungen mit Resultaten, die mit optischer Mikroskopie erzielt wurden, zeigt, daß die Untersuchung der aktiven und stabilen Bereiche mit weichen AFM-Cantilevern das System nicht nachhaltig stört.

Für Hühnerherz-Fibroblasten zeigten Felder und Elson, daß der Ausstreckvorgang nach einer kurzen Phase starker Beschleunigung mit nahezu konstanter Geschwindigkeit abläuft, während sich sogenannte Ruffles auf der apikalen Zellmembran gegenläufig bewegen [121]. Ruffles sind zusammenhängende, mehrere μ m hohe Ausstülpungen des Lamellipodiums, die sich in aktiven Bereichen einer kriechenden

Zelle durch lokale Aktinpolymerisation bilden und danach über den Zellrücken nach hinten wandern [132]. Man vermutet, daß diese Strukturen eine wichtige Rolle bei der Zellwanderung spielen.

Abgesehen von kurzzeitigen, zu geringen Verdickungen des Lamellipodiums (z. B. bei 750s und 1300s in Abbildung 7.3) wurden in den vorliegenden Messungen keine Ruffles beobachtet. Deshalb muß geklärt werden, ob Ruffles bei der Aufnahme der Kraftkurven von der AFM-Spitze so stark komprimiert werden, daß sie weder im Höhen- noch im Elastizitätsprofil zu erkennen sind. Man kann argumentieren, daß Ruffles vergleichsweise harte Strukturen sind [121], und daher von der AFM-Spitze nicht vollständig komprimiert werden können. Um auch experimentell zu zeigen, daß Ruffles mit Hilfe von Force Maps tatsächlich detektierbar wären, wurde mit der AFM-Spitze ein Lamellipodium einer kriechenden Zelle vorsichtig vom Substrat gelöst und danach im Force-Mapping-Modus untersucht. Sowohl im Höhen- als auch im Elastizitätsbild war die künstlich erzeugte, ruffle-artige Struktur deutlich zu sehen (nicht gezeigt). Die Abwesenheit solcher Strukturen in Abbildung 7.3 ist also darauf zurückzuführen, daß die untersuchte Zelle keine ausgeprägten Ruffles aufweist. Allerdings ist es möglich, daß die beobachteten Höhenfluktuationen (siehe Kapitel 7.1.3, Abbildung 7.6) auf die Rückwärtsbewegung sehr kleiner Ruffles zurückzuführen sind.

7.1.3 Höhenfluktuationen

Mit Hilfe der aufeinanderfolgenden Zeilen von Kraftkurven (Abbildung 7.3 und Abbildung 7.4), können Höhe und Elastizitätsmodul an festen Positionen innerhalb aktiver und stabiler Bereiche als Funktionen der Zeit untersucht werden. In Abbildung 7.6 sind die zeitlichen Variationen in der Höhe für Punkte dargestellt, die je 700nm hinter dem Zellrand liegen. An diesen Stellen sind beide Regionen vergleichbar dick (etwa 800nm), so daß der Einfluß der harten Unterlage auf die Auswertung der Kraftkurven im Vergleich vernachlässigt werden kann. Auf dem aktiven Lamellipodium sind die Höhenfluktuationen wesentlich größer. Zeitabhängige Fluktuationen sind auch im Elastizitätsmodul zu beobachten (nicht gezeigt), jedoch sind diese, wahrscheinlich aufgrund des Einflusses des Substrats, stark mit den Höhenfluktuationen korreliert. Die Unterschiede der Fluktuationen in aktiven und stabilen Bereichen sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Dynamik der Umstrukturierung des Zytoskeletts in beiden Regionen zurückzuführen .

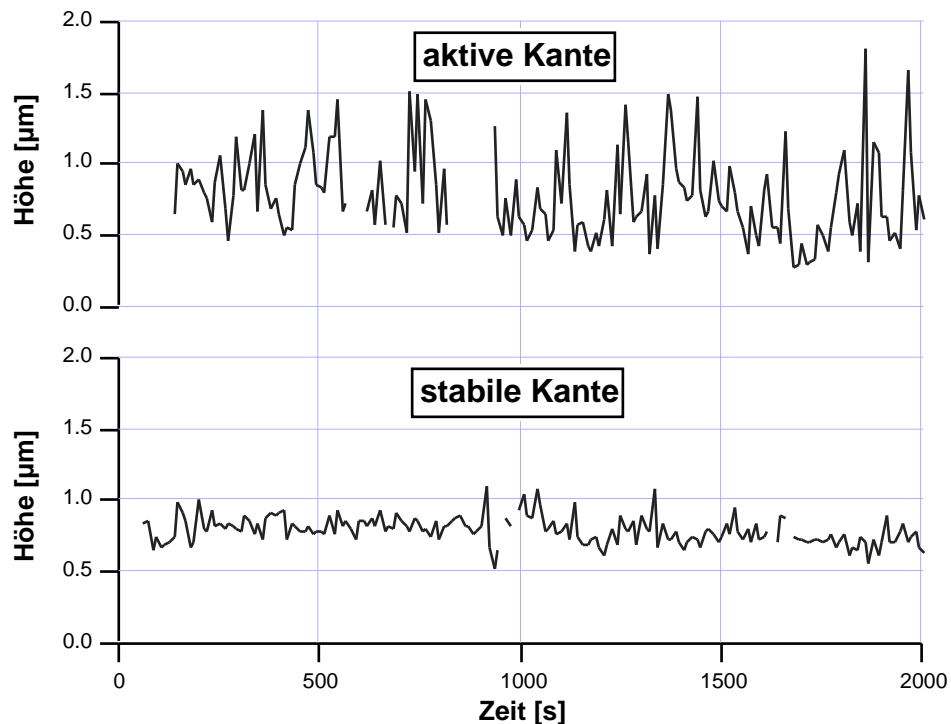


Abbildung 7.6: Fluktuationen der Zellhöhe auf dem aktiven Lamellipodium (oben) bzw. auf der stabilen Region (unten) 700nm vom Zellrand entfernt, aufgetragen gegen die Zeit.

7.1.4 Mittlere Höhen- und Elastizitätsprofile

Neben dem lokalen Elastizitätsmodul ist auch die Topographie lebender Zellen eine mit anderen Techniken kaum zugängliche Größe. Mit Hilfe der kombinierten Messung beider Größen für aktive und stabile Bereiche sind Rückschlüsse auf den Mechanismus des Kriechens der Zelle möglich. Besonders interessant sind dafür zeitlich gemittelte Profile der Höhe und der Elastizität entlang der Rasterlinien.

Um solche mittleren Profile zu berechnen, wurden alle Zeilen in Abbildung 7.3 und Abbildung 7.4 so verschoben, daß der Zellrand in jeder Zeile bei der gleichen lateralen Position lag. Die Profile erhält man dann durch Mittelung innerhalb der Spalten. Für jede Spalte, d. h. für jede laterale Position ergibt sich für Höhe und Elastizität je ein Mittelwert mit je einem zugehörigen Wert der Standardabweichung.

Abbildung 7.7 zeigt die mittleren Profile und die Standardabweichung (punktiert) für die untersuchte aktive Region. Das Lamellipodium ist mit $0,7\text{-}0,8\mu\text{m}$ sehr flach und weist bis zum Zellrand eine homogene Elastizitätsverteilung auf. Die berechneten Elastizitätsmoduli müssen als Obergrenze für die tatsächlichen Werte angesehen werden, da trotz Auswertung der Kraftkurven im niedrigstmöglichen Fitbereich (siehe Kapitel 3.3.6) das unter der Zelle befindliche Substrat die Messung beeinflusst.

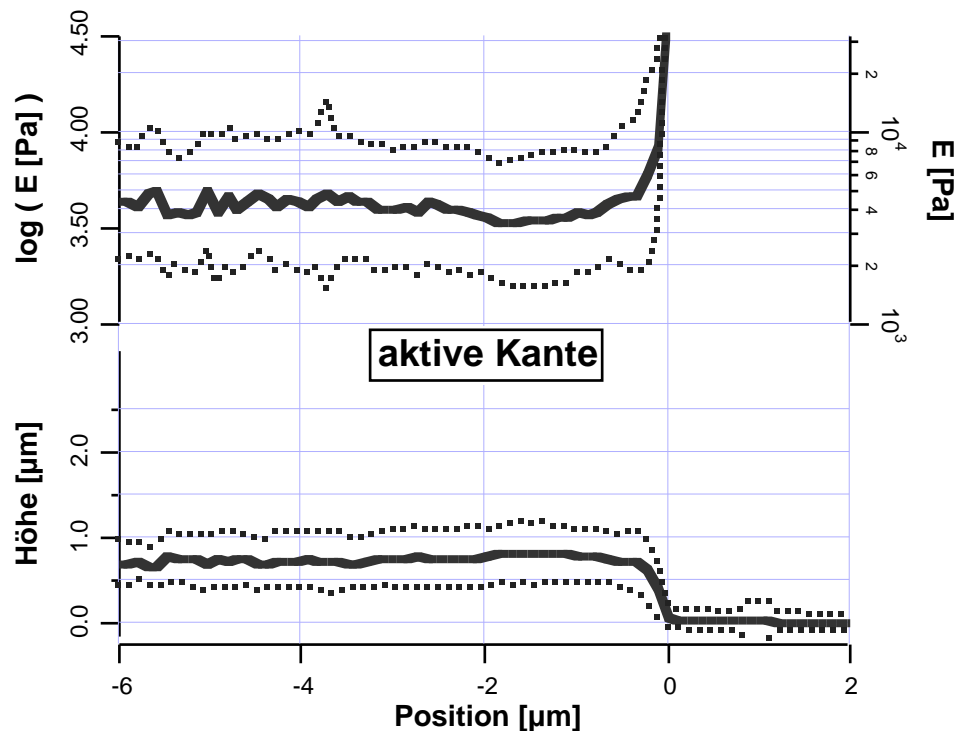


Abbildung 7.7: Zeitlicher Mittelwert des Elastizitätsmoduls (oben) und der Höhe (unten) des aktiven Lamellipodiums als Funktion des Abstands vom Zellrand (punktuelle Linien geben die Standardabweichung an).

Für die stabile Region wurde eine analoge Berechnung durchgeführt. Die Profile sind in Abbildung 7.8 zu sehen. Die Höhe der Zelle steigt auf einer kurzen Strecke bereits auf $2,8\mu\text{m}$ an. Im Vergleich zur aktiven Region ist das Elastizitätsprofil sehr inhomogen. Die lokalen Maxima (Pfeile) spiegeln die in Abbildung 7.4 beobachtete Bandstruktur wieder und sind auf senkrecht zur Rasterlinie verlaufende Spannungsfasern zurückzuführen. Abseits der Spannungsfasern sind die berechneten Werte des Elastizitätsmoduls unabhängig vom Fitbereich, also auch quantitativ zuverlässig.

Die zahlreichen Modellvorstellungen über den Mechanismus, der das Kriechen lebender Zellen ermöglicht, können in verschiedene Klassen eingeteilt werden [117,133]. Das Ausstrecken könnte demnach angetrieben werden durch Aktin-Polymerisation, durch Myosin-I-Motoren, durch eine Kombination dieser Mechanismen, durch osmotisches Quellen des Aktin-Gels oder durch sogenanntes Blebbing (Zahncrmetuben-Modell). Die Regulierung der Phasen des Ausstreckens und Zurückziehens, die z. B. für die beobachteten Fluktuationen der Randposition verantwortlich wäre, scheint ein außerordentlich komplexer Vorgang zu sein. Eine Phase des Ausstreckens könnte z. B. zurückzuführen sein auf explosionsartige Aktinpolymerisation, auf eine Reduktion des durch Myosin I angetriebenen Zurückziehens, auf

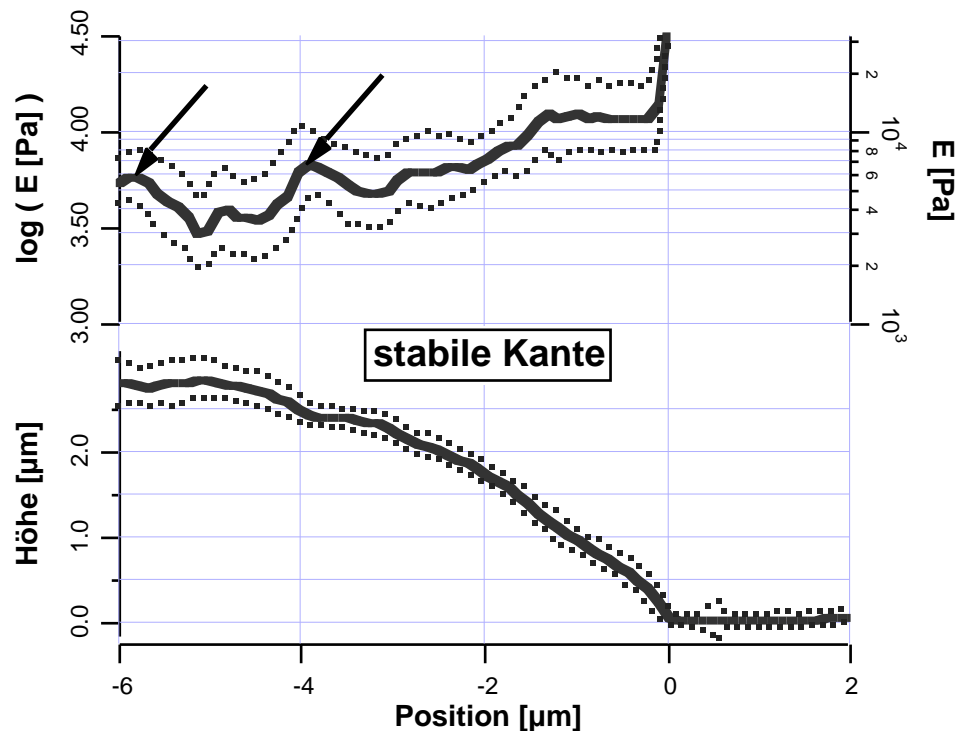


Abbildung 7.8: Zeitlicher Mittelwert des Elastizitätsmoduls (oben) und der Höhe (unten) des stabilen Bereichs als Funktion des Abstands vom Zellrand (punktierte Linien geben die Standardabweichung an). Die Pfeile zeigen lokale Maxima des Elastizitätsmoduls, die durch Mittelung über die Bandstruktur in Abbildung 7.4b entstanden sind und senkrecht zur Rasterlinie verlaufende Spannungsfasern repräsentieren.

eine verstärkte Kopplung des Aktinnetzwerks an das Substrat, die den Rückfluß von Aktin verhindert, oder auf ein Zusammenwirken solcher Faktoren [134]. Verstärkte Myosinaktivität oder reduzierte Aktinpolymerisation hätten dagegen Phasen des Zurückziehens zur Folge.

Beim Blebbing-Mechanismus kontrahiert die gesamte Zelle. Gleichzeitig nimmt die Spannung der Membran am Rand des aktiven Bereichs ab, so daß der in der Zelle aufgebaute Druck zur Ausstülpung des Lamellipodiums führt. Diese mehrere μm große Ausstülpung [135,136] füllt sich langsam mit Aktinfilamenten, die dann quervernetzt werden. In dieser Phase wäre der sogenannte Bleb noch deutlich weicher als intakte Zytoskelett-Strukturen [133,136,137]. Das bestätigen auch die in Kapitel 6 besprochenen Experimente, in denen gezeigt wurde, daß durch Verlust filamentärer Aktinstrukturen der Elastizitätsmodul der Zelle abnimmt. Da ein Weicherwerden des Lamellipodiums auf einer Skala von mehreren μm nicht beobachtet wurde (Abbildung 7.7), ist das Blebbing-Modell für 3T3-Fibroblasten nicht konsistent mit den gezeigten Messungen. Es gibt allerdings Zelltypen, in denen Blebbing der vorherrschende Bewegungsmechanismus ist [135,136].

In analoger Weise kann gegen das osmotische Quellen des Aktin-Gels argumentiert werden, das von Oster und Perelson postuliert wurde [138]. Das Modell setzt voraus, daß zunächst im Lamellipodium durch Auflösung der Quervernetzung der Filamente ein Aktin-Gel entsteht, das danach durch osmotisch getriebenes Quellen das Lamellipodium nach vorn schiebt. Die Auflösung der Quervernetzung ist analog zum Abbau der Aktinfilamente durch z. B. die Cytochalasine und würde demnach zu einer meßbaren Abnahme des lokalen Elastizitätsmoduls der Zelle führen. Die Messungen schließen also einen solchen Mechanismus ebenfalls aus, falls sich das Weicherwerden nicht auf einen etwa 100nm breiten Streifen am Zellrand beschränkt und somit nicht auflösbar wäre.

Dagegen sind die Messungen sowohl konsistent mit dem Aktin-Polymerisations-Mechanismus, der auch als Brownsche Ratsche bekannt ist [139] als auch mit einem Mechanismus, der die Polymerisation von Aktin und den Einsatz von Myosin-Motoren kombiniert, um das aktive Lamellipodium vorwärts zu schieben [117]. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß einerseits das Aktin-Polymerisations-Modell die beobachteten Geschwindigkeiten erklären kann [139], und daß andererseits auch die nötige Diffusionsrate von Aktinmonomeren in den aktiven Bereich gewährleistet ist [140]. Die originale Brownsche Ratsche geht davon aus, daß die Zellmembran des aktiven Lamellipodiums aufgrund Brownscher Bewegung fluktuiert. Dabei werden lediglich Membranauslenkungen vorausgesetzt, die größer als der Durchmesser eines Aktin-Monomers sind (etwa 5nm), so daß jeweils ein Monomer zwischen die Membran und die äußeren Enden der Filamente eingefügt werden kann. In einer Abwandlung des Modells würde die Verbiegung des äußersten Aktinfilaments die Einfügung von Monomeren ermöglichen, falls die Membranfluktuationen zu stark gedämpft werden [141]. Es ist auch möglich, daß durch Kontraktion erzeugter hydrostatischer Druck innerhalb der Zelle für die nötige Membranauslenkung sorgt [142]. In allen drei Fällen wäre das damit verbundene Weicherwerden des Lamellipodiums im Force-Mapping-Modus sowohl zeitlich als auch lateral nicht auflösbar. Auch die verschiedenen Varianten des Myosin-Motor-Mechanismus gehen von konstanten Materialeigenschaften der Zelle bis hin zum Rand der aktiven Region aus - eine Ansicht, die durch elektronenmikroskopische Aufnahmen des dichten Aktinnetzwerks in Lamellipodien unterstützt wird [143,144].

Kortikale Spannung ist ein Begriff, der oft verwendet wird, um Eigenschaften kriechender Zellen zu erklären [145]. Mit Hilfe des Force-Mapping-Modus können Elastizitätsmoduli bestimmt werden. Die Elastizitätsmoduli sind ein Maß für die kortikale Steifheit, die wiederum z. T. mit der kortikalen Spannung zusammenhängt. So ist z. B. die Tatsache, daß der Rand des aktiven Lamellipodiums (d. h. die äußeren 4µm) weicher ist als die stabile Region, konsistent mit der Beobachtung, daß in sich ausbreitenden Bereichen der Zelle geringere kortikale Spannung auftritt [146].

7.2 Keratocyten

Im Anschluß an die Experimente mit kriechenden 3T3-Fibroblasten wurden ähnliche Messungen an Keratocyten durchgeführt. Keratocyten sind besonders geeignet für die Untersuchung des Bewegungsvorgangs, da sie angetrieben von einem breiten, fächerförmigen Lamellipodium schnell (bis 30µm/min) und gleichmäßig kriechen [147,148]. Im Gegensatz zur unregelmäßigen Bewegung von Fibroblasten gleiten Keratocyten kontinuierlich über die jeweilige Unterlage, wobei die Form der Zelle nahezu unverändert bleibt [43]. Die von kriechenden Keratocyten auf die Unterlage ausgeübten Zugkräfte konnten orts aufgelöst gemessen werden, indem die Zellen auf einem elastischen Substrat ausgesät wurden und die Auslenkung kleiner Kugeln bestimmt wurde, die in das Substrat eingebettet waren [42]. Während an der Vorderseite der Keratocyten keine Zugkräfte gemessen wurden, traten maximale Kräfte an den Seiten der Zelle auf, die senkrecht zur Bewegungsrichtung zelleinwärts gerichtet waren. Diese Zugkräfte könnten auf aktive Aktin-Myosin-Kontraktion, aber auch auf eine Erhöhung der kortikalen Spannung zurückzuführen sein. Eine Messung der kortikalen Steifheit kann darüber Aufschluß geben.

Da Keratocyten so schnell kriechen, daß Messungen im Force-Mapping-Modus unmöglich sind, wurden die Zellen während der Experimente auf etwa 10°C gekühlt, indem Bechergläser mit einer Eis-Wasser-Mischung auf den Objektisch des optischen Mikroskops gestellt wurden. Unter der Plexiglaskiste (siehe Kapitel 3.2: Versuchsaufbau) stellt sich dann nach etwa einer Stunde ein Temperaturgleichgewicht ein. Trotzdem konnten nur wenige aufeinanderfolgende Zeilen von Kraftkurven entlang von Linien senkrecht zum vorderen bzw. seitlichen Rand der Zelle (vgl. Abbildung 7.2) aufgenommen werden, weil sich die Zellen immer noch zu schnell bewegten. So mußte einerseits die Position der Linie oft nachgeregelt werden, an-

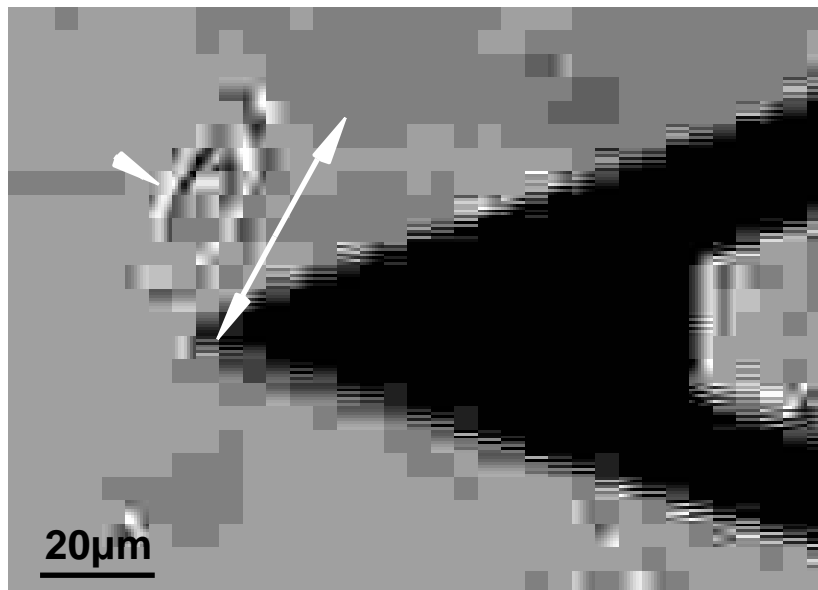


Abbildung 7.9: Untersuchung eines kriechenden Keratocyten. Entlang der angegebenen Linie werden Kraftkurven aufgenommen, während sich die Zelle in Richtung des Pfeilkopfs bewegt. Durch die Bewegung des Keratocyten senkrecht zur Linie entsteht ein zweidimensionales Elastizitätsbild der Zelle.

dererseits führten häufige Richtungsänderungen in der Zellbewegung dazu, daß die Linie relativ zum Lamellipodium auch lateral verschoben wurde.

Eine Möglichkeit, trotz der hohen Geschwindigkeit der Zellen zweidimensionale Elastizitätsbilder von Keratocyten zu erhalten besteht darin, entlang einer Linie parallel zum vorderen Rand der Zelle Kraftkurven aufzunehmen. Die Verschiebung entlang der vertikalen Bildachse wird dabei nicht durch das übliche Rastern mit dem AFM erzielt, also indem die AFM-Spitze relativ zur Probe verschoben wird, sondern durch das aktive Kriechen der Zelle relativ zur AFM-Spitze. Diesen Vorgang veranschaulicht Abbildung 7.9. Während der Keratocyt also über die Rasterlinie kriecht, baut sich aus den aufeinanderfolgenden Zeilen eine „normale“, zweidimensionale Force Map auf, aus der ein - allerdings verzerrtes - Elastizitätsbild der Zelle berechnet werden kann.

Solche Elastizitätsbilder zeigt Abbildung 7.10. Man erkennt deutlich die fächerförmigen Lamellipodien und die Zellkerne. Bei (d) handelt es sich um eine Zelle, die zu Beginn der Messung noch mit einem größeren Zellverband verbunden war (links unten) und deshalb noch nicht kriechen konnte. Daher wurde in diesem Fall eine normale, zweidimensionale Force Map aufgenommen. In Abbildung 7.10a-c treten an den unteren Bildrändern „Schatten“ hinter der Zelle auf, die darauf zurückzuführen sind, daß der Cantileverarm auf dem Zellkern aufliegt, bevor die AFM-Spitze das

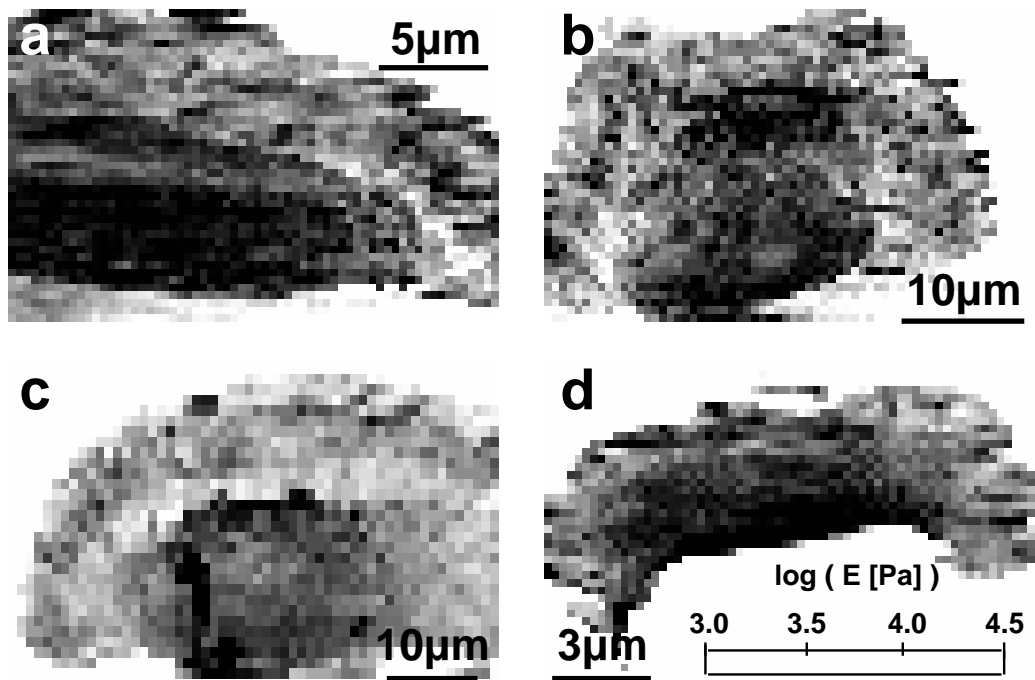


Abbildung 7.10: Elastizitätsbilder kriechender Keratocyten, aufgenommen mit dem in Abbildung 7.9 veranschaulichten Verfahren. Ausgeprägte weiche Gebiete am vorderen Rand der Zellen im Vergleich zu den seitlichen Gebieten sind nicht zu beobachten. Die Zelle in (a) und (b) ist dieselbe, die in Abbildung 7.9 zu sehen ist.

Substrat berührt. Die resultierenden Kraftkurven sind verzerrt und ihr Verlauf kann nicht mit dem Hertz-Modell beschrieben werden.

An den Seiten des Lamellipodiums treten im Vergleich zum vorderen Rand der Zelle keine erhöhten Elastizitätsmoduli auf. Die kortikale Steifheit scheint also im gesamten Lamellipodium nahezu konstant zu sein. Damit unterstützen diese Messungen die Annahme, daß eine aktive Aktin-Myosin-Kontraktion zum Aufbau der starken Zugkräfte an den Seiten des Lamellipodiums führt. Unterschiede in der kortikalen Spannung erscheinen als Erklärung unwahrscheinlich.

7.3 MTLn3-Zellen

Metastasis, d. h. die Besiedelung räumlich entfernter Organe durch einen bösartigen Tumor, ist ein komplexer Prozeß, der von verschiedenen, sequentiell ablaufenden Ereignissen abhängt [149,150]. Die sogenannte 3-Schritt-Hypothese über die Tumor-Invasion unterteilt den Prozeß in die Ausbildung fester Kontakte zur extrazellulären Matrix, den Abbau der Matrix und das Kriechen der Tumorzellen aus dem befallenen Gewebe [151]. Die Tumorzelle gelangt so in Lymph- oder Blutgefäße und kann dann eine Metastase an einem anderen Ort etablieren, indem sie dort die gleichen Schritte

wiederholt. Eine der Schlüsselfunktionen der Metastasis ist somit das Kriechen der Zellen, das bei der Metastasis vermutlich chemotaktisch stimuliert wird [152,153].

Chemotaxis ist die gerichtete Bewegung von Zellen als Reaktion auf einen chemischen Stimulus. Zahlreiche grundlegende biologische Prozesse wie z. B. Embryogenese, Neuritenwachstum, Wundheilung, Entzündung oder Metastasis beruhen auf chemotaktischen Reaktionen. Stimulation mit chemischen Lockstoffen bewirkt in schnell kriechenden Zellen wie Dictyostelium, Neutrophilen oder Blutplättchen einen Anstieg der Aktin-Polymerisation [154-156].

MTLn3 ist eine metastatische Zelllinie, die aus einer Lungen-Metastase des 13762 NF Adenokarzinoms von Ratten kloniert wurde [157]. Auf die Zugabe des chemischen Lockstoffs EGF (Epidermal Growth Factor) reagieren diese Zellen innerhalb von 1-3min mit dem Ausstrecken F-Aktin-gefüllter Lamellipodien [158]. Messungen mit der Mikro-Chemotaxis-Kammer haben gezeigt, daß die chemotaktische und chemokinetische Reaktion von MTLn3-Zellen bei 5nM EGF maximal ist [158]. Cytochalasin D hemmt die Anreicherung von Aktinfilamenten in aktiven Regionen, das Ausstrecken der Lamellipodien und die gerichtete Bewegung der Zellen entlang des Konzentrationsgradienten des Lockstoffs. Das zeigt, daß EGF sowohl die Polymerisation als auch die Depolymerisation von Aktin stimuliert [159].

Es ist unklar, ob die Polymerisation durch die Durchtrennung vorhandener Aktinfilamente, durch die Freilegung der Plus-Enden, durch Bereitstellung von Aktinmonomeren oder durch Neubildung von Filamenten verursacht wird [133,160]. Analog zu den Experimenten an kriechenden 3T3-Fibroblasten wurde deshalb versucht, mit Hilfe von AFM-Messungen Aussagen über den Kriechmechanismus und insbesondere über die Art und Weise der Polymerisation zu treffen.

Abbildung 7.11 veranschaulicht die chemotaktische Wirkung von EGF in einer Zeitserie von Auslenkungsbildern einer Gruppe von MTLn3-Zellen. Bei einer Abtastrate von 1Hz (eine Zeile pro Sekunde) ergibt sich eine Aufnahmedauer von 5min pro Bild. Das erste Bild (a) wurde als Referenz vor der Zugabe von EGF aufgenommen. Die Zellen weisen unregelmäßig geformte flache Lamellipodien auf, deren Oberfläche wellige Strukturen zeigt. Dabei könnte es sich um sogenannte Ruffles handeln (siehe Kapitel 7.1.2, Seite 101). Nach 5min sind die Strukturen weitgehend verschwunden, und dünne Lamellipodien mit glatter Oberfläche werden ausgestreckt (b). Die Lamellipodien erreichen innerhalb von etwa 15min ihre maximale Fläche (c,d). Während

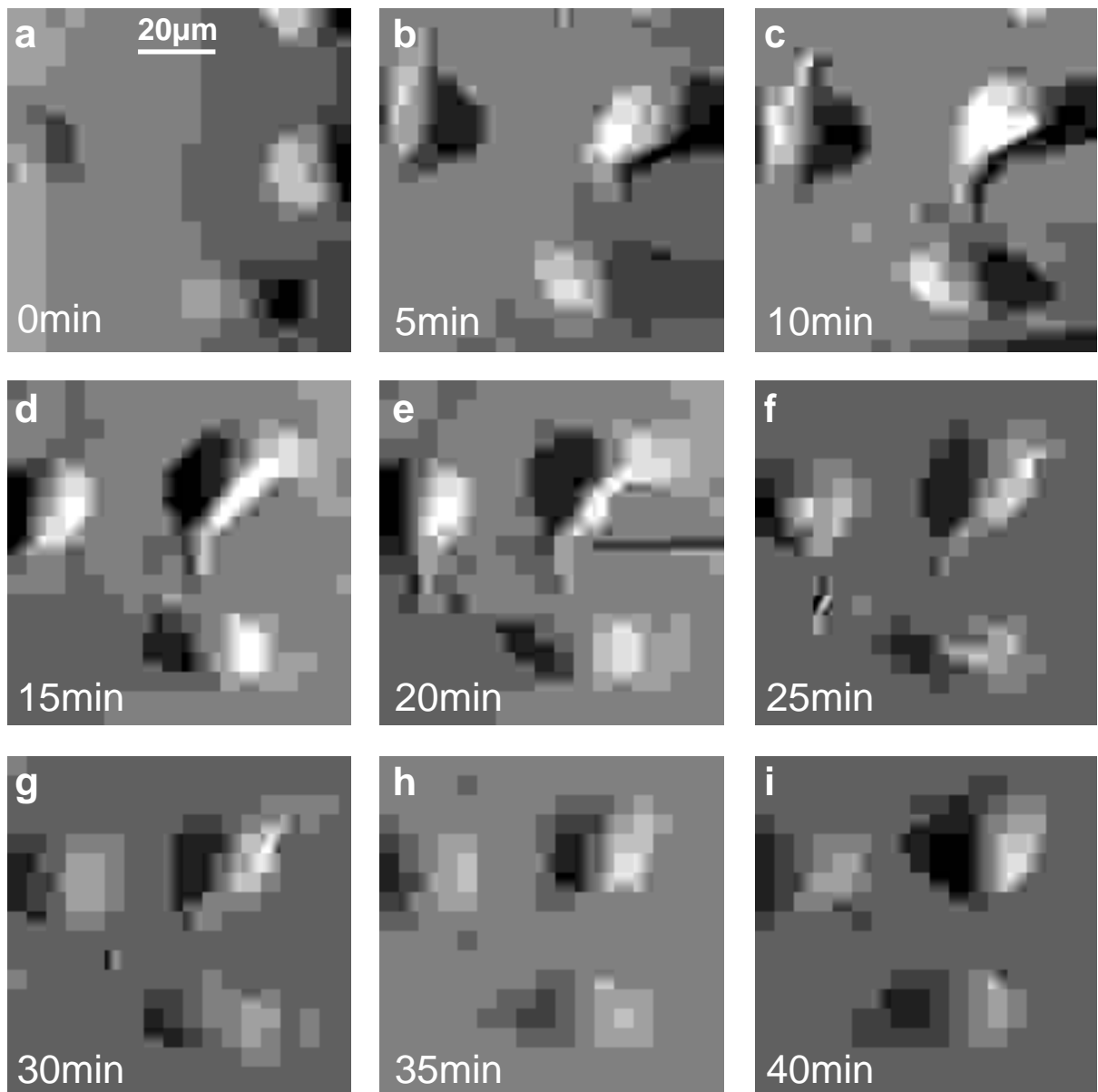


Abbildung 7.11: Zeitserie von Auslenkungsbildern einer lebenden MTLn3-Zelle, aufgenommen während der chemotaktischen Stimulation mit 5nM EGF. (a) Referenz. Auf den Lamellipodien sind Strukturen (evtl. Ruffles) erkennbar. (b-i) Aufeinanderfolgende Bilder nach Zugabe von EGF. Innerhalb der ersten 15min werden flache Lamellipodien ausgestreckt, deren Oberflächen kaum Strukturen aufweisen. Danach bleibt die Zellfläche etwa erhalten und die Lamellipodien bilden Strukturen wie in (a).

der folgenden 25min bilden sich allmählich wieder wellige Strukturen wie in (a), wobei die Fläche, aber nicht die Form der Zelle nahezu unverändert bleibt.

Die Beobachtung, daß EGF die Ruffling-Aktivität der Zelle vorübergehend zum Stillstand bringt, wurde bereits mit optischen Methoden von Segall *et al.* gemacht [158]. Das unterstützt einerseits die Annahme, daß es sich bei den in (a) und (f-i) beobachteten Strukturen um Ruffles handelt, und belegt andererseits, daß die AFM-Untersuchungen das Verhalten der Zellen nicht stark beeinflussen.

Detaillierte Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der EGF-induzierten chemotaktischen Reaktion von MTLn3-Zellen haben gezeigt, daß die Zellen nach einer Minute beginnen, Lamellipodien auszustrecken und ihre maximale Oberfläche 4min nach Zugabe des Lockstoffs erreichen [158]. Danach wurde ein langsames Zurückziehen der Lamellipodien beobachtet, wobei die Zellfläche jedoch insgesamt größer bleibt als vor der Zugabe von EGF. Eine vergleichbare Kinetik des EGF-Effekts zeigt sich auch bei den AFM-Messungen, allerdings auf einer deutlich längeren Zeitskala. Die Verzögerung des Effekts kann wieder durch den konvektionslimitierten Transport des Lockstoffs in der Petrischale vom Ort der Zugabe zur Zelle erklärt werden (vgl. Kapitel 6.2).

Abbildung 7.12a zeigt ein Auslenkungsbild einer MTLn3-Zelle, das 50min nach Zugabe von EGF aufgenommen wurde. Beobachtungen mit dem optischen Mikroskop zufolge hatte die Zelle bereits vor diesem Zeitpunkt (nach etwa 20min) ihre maximale Ausdehnung erreicht. Auf den Lamellipodien erkennt man wieder wellige Strukturen, bei denen es sich vermutlich um Ruffles handelt. In (b) und (c) sind ein reales Höhenbild und ein Elastizitätsbild derselben Zelle zu sehen, die aus einer unmittelbar vor dem Kontaktbild (a) aufgenommenen Force Map berechnet wurden. Auf dem Kern ist die Zelle etwa $4\mu\text{m}$ hoch, während die Lamellipodien nur etwa 400nm dick sind. Hier wird der Verlauf der Kraftkurven schon bei sehr niedrigen Kräften von der unter der Zelle befindlichen harten Unterlage beeinflusst (vgl. Kapitel 3.3.6). Die berechneten Werte der Elastizitätsmoduli sind in diesen Bereichen nicht zuverlässig und stellen nur eine obere Grenze für die tatsächlichen Werte dar. Der Elastizitätskontrast zwischen Zellkern und Lamellipodien in (c) ist also ein Artefakt. Trotz dieser

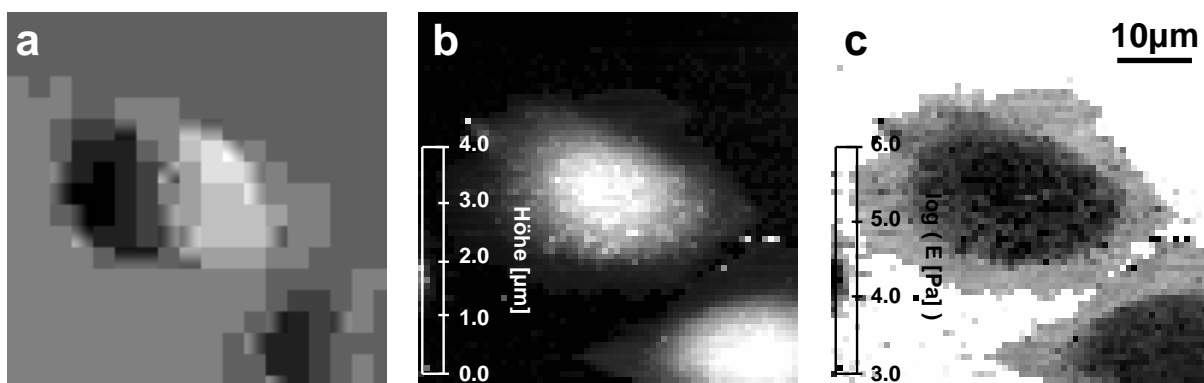


Abbildung 7.12: Auslenkungsbild, reales Höhenbild und Elastizitätsbild einer MTLn3-Zelle 50min nach der Zugabe von EGF. Aufgrund des Einflusses des Substrats sind die berechneten Werte der Elastizitätsmoduli auf dem dünnen Lamellipodium zu groß.

Einschränkungen sind relative Unterschiede in der Elastizität auch auf solchen dünnen weichen Proben meßbar. Die sehr homogene Verteilung der Elastizitätsmoduli in den Lamellipodien ist daher real.

Da die chemotaktische Reaktion der MTLn3-Zellen auf EGF auf einer Zeitskala stattfindet, die im normalen Force-Mapping-Modus nicht auflösbar ist, mußte bei den Elastizitätsmessungen auf zweidimensionale laterale Auflösung verzichtet werden. Wie bei der Untersuchung kriechender 3T3-Fibroblasten wurden im „y-disable“-Betriebsmodus kontinuierlich Kraftkurven entlang einer Linie senkrecht zum Zellrand

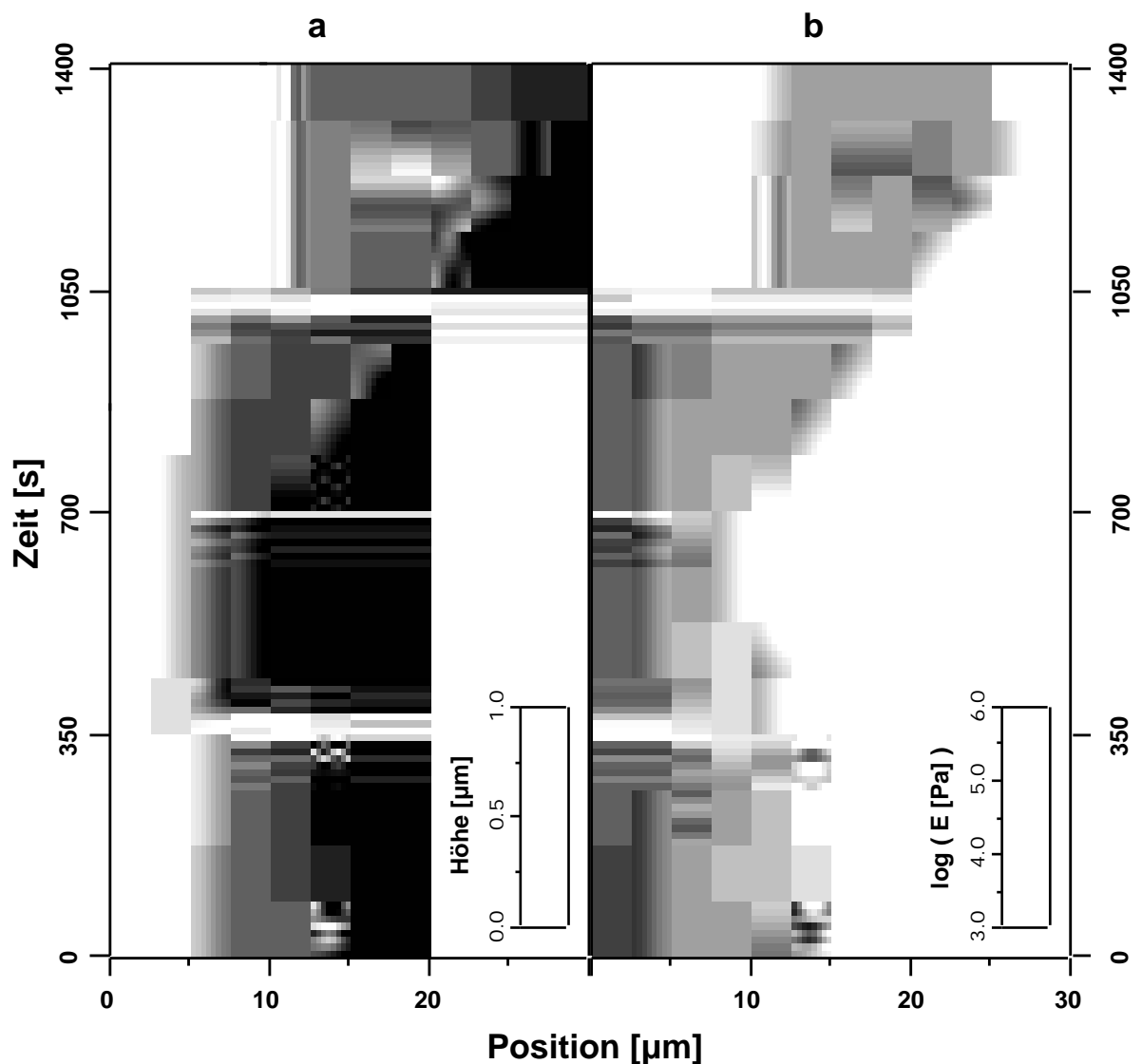


Abbildung 7.13: Aufeinanderfolgend aufgenommene Zeilen von Kraftkurven entlang einer festen Linie senkrecht zum Rand des Lamellipodiums einer MTLn3-Zelle. Die Kraftkurven wurden hinsichtlich realer Höhe (a) und Elastizitätsmodul (b) ausgewertet und gegen die Zeit (vertikale Achse) aufgetragen. Nach 350s wurden 5nM EGF zugegeben. Weitere 350s später setzt die chemotaktische Reaktion ein. Das Lamellipodium wird innerhalb von 600s gleichförmig um insgesamt etwa 17µm ausgestreckt.

aufgenommen (siehe Kapitel 7.1.1). Abbildung 7.13 zeigt die daraus berechneten Zeitserien von Höhen- und Elastizitätsprofilen.

Am rechten Bildrand verläuft die Rasterlinie über den Zellkern, der im Elastizitätsprofil wieder deutlich weicher erscheint als das Lamellipodium. Die ersten 350s des Experiments dienen als Referenz. Das Lamellipodium zieht sich am untersuchten Ort langsam zurück. Danach wurde ein Tropfen einer hochkonzentrierten EGF-Stammlösung zugegeben, so daß die mittlere Konzentration in der Petrischale bei 5nM lag. Die chemotaktische Reaktion der Zelle auf EGF setzt nach weiteren 350s ein. Innerhalb der anschließenden 600s streckt sich das Lamellipodium um etwa 17µm aus. Das entspricht einer mittleren Geschwindigkeit von 28nm/s. Der Vorgang verläuft somit deutlich schneller als das Ausstrecken der aktiven Bereiche kriechender Fibroblasten (5,5nm/s, vgl. Kapitel 7.1.2).

Die Phase des Ausstreckens geht nach 600s abrupt in ein langsames Zurückziehen des Lamellipodiums über. Gleichzeitig ist in dem hier gezeigten Datensatz eine zeitlich begrenzte Störung zu beobachten. Bei dieser lokalen Erhöhung des Lamellipodiums könnte es sich wieder um einen Ruffle handeln, der jedoch nicht zur Zellmitte wandert, sondern evtl. aufgrund der Störung durch die AFM-Spitze nach etwa einer Minute wieder verschwindet. Der Elastizitätskontrast dieser Struktur zur Umgebung ist wahrscheinlich ein Artefakt, das durch die lokal größere Probendicke und den demzufolge geringeren Einfluß des Substrats verursacht wird.

Im Gegensatz zu Fibroblasten beobachtet man bei MTLn3-Zellen praktisch keine Fluktuationen in der Randposition. Das Ausstrecken des Lamellipodiums ist eine sehr gleichförmige Bewegung, die mit nahezu konstanter Geschwindigkeit abläuft. Auch die gemessenen Höhen fluktuieren im Zeitverlauf kaum. Diese Unterschiede legen die Annahme nahe, daß die Bewegung in den beiden Fällen auf verschiedenen Mechanismen beruht.

In Abbildung 7.14 sind mittlere Höhen- und Elastizitätsprofile des sich ausstreckenden Lamellipodiums zu sehen (vgl. Kapitel 7.1.4). Um den Einfluß hoher Gebiete (Zellkern, „Ruffle“) zu vermeiden, erfolgte die Mittelung nur im Bereich zwischen 800 und 1200 Sekunden.

Mit 400-500nm ist das Lamellipodium extrem dünn. In Abbildung 7.13 erkennt man bereits, daß die äußeren 1-2µm des Lamellipodiums höher sind als dahinter liegende Bereiche. Das Höhenprofil bestätigt diese Beobachtung. Fluoreszenzoptische Mes-

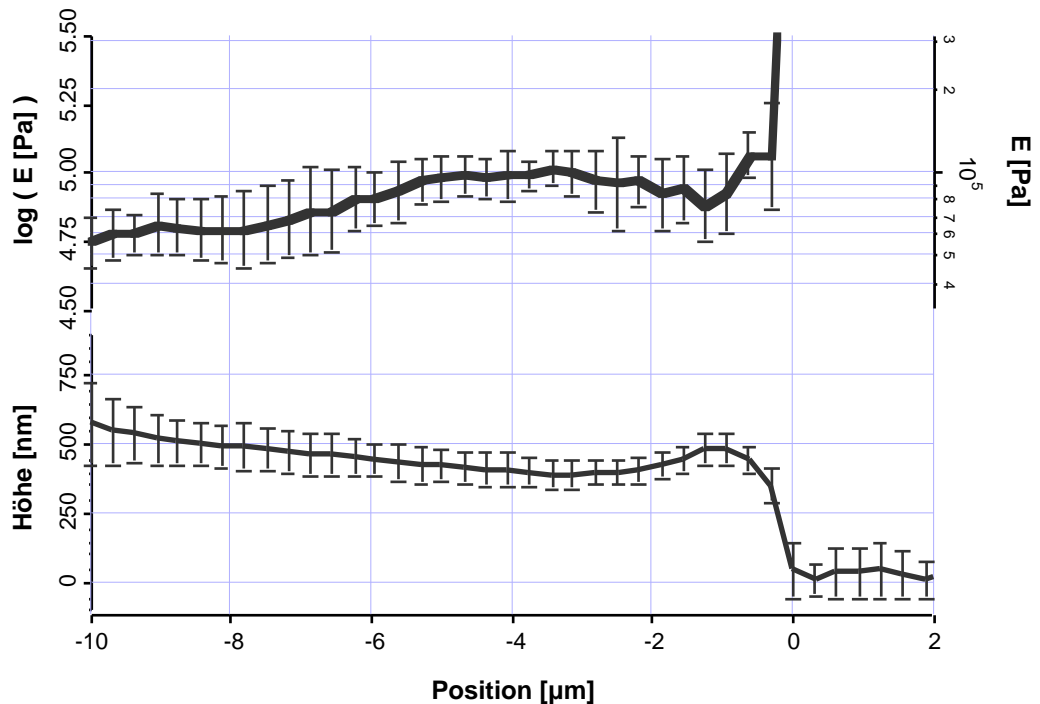


Abbildung 7.14: Zeitlicher Mittelwert des Elastizitätsmoduls (oben) und der Höhe (unten) des Lamellipodiums als Funktion des Abstands vom Zellrand (Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die Mittelung erfolgte im Intervall 800-1200s).

sungen haben gezeigt, daß in diesen Randbereichen ein starker Anstieg der F-Aktin-Konzentration während der chemotaktischen Reaktion auftritt [158].

Im Elastizitätsprofil erscheint der Rand des Lamellipodiums weicher als dahinter liegende, flachere Regionen. Allerdings korreliert der Verlauf der Elastizität stark mit dem Höhenprofil. Je dünner die weiche Probe ist, desto stärker wird der Einfluß der darunter liegenden harten Unterlage auf die berechneten Elastizitätsmoduli. Aufgrund dieser Korrelation kann die kombinierte Höhen- und Elastizitätsinformation nicht wie bei den kriechenden Fibroblasten verwendet werden, um Rückschlüsse auf den Mechanismus der Bewegung zu erhalten.

Da das Experiment mit den derzeit weichsten kommerziell erhältlichen Cantilevern durchgeführt wurde, ist damit die Grenze der momentanen technischen Möglichkeiten erreicht. Sobald jedoch Fortschritte in der Halbleitertechnologie die Herstellung weicherer Cantilever ermöglichen, könnte eine ähnliche Messung wichtige Erkenntnisse über die Fortbewegung von Krebszellen liefern. Eine Alternative zu den instrumentellen Verbesserungen stellen Finite-Elemente-Simulationen dar, mit deren Hilfe z. B. der Verlauf von Kraftkurven auf sehr dünnen, weichen Filmen berechnet werden kann. Solche Simulationen werden erst seit kurzem von J. Domke entwickelt [52] und können daher noch nicht bei der Auswertung der Kraftkurven eingesetzt werden.

8. Cuticula

Pflanzen benötigen einen Mechanismus, der verhindert, daß sie Wasser verlieren. Zu diesem Zweck besitzen die Teile hochentwickelter Pflanzen, die direktem Kontakt mit der Luft ausgesetzt sind, eine extrazelluläre Schicht, die fest mit der Zellwand der Epidermis verbunden ist. Diese Schicht nennt man Cuticula. Bei vielen Spezies sind in die Cuticula sogenannte Stomata eingebettet, die aktiv geöffnet und geschlossen werden können und so den kontrollierten Austausch von Wasser ermöglichen. Wenn die Stomata aufgrund ungünstiger Umgebungsbedingungen geschlossen sind, müssen durch die Cuticula Wasser, Gas und Ionen ausgetauscht werden. Trotz ihrer Funktion als Barriere zwischen der Pflanze und der umgebenden Luft ist die Cuticula deshalb in geringem Umfang permeabel für Wasser und andere Moleküle [161].

Die Cuticula ist eine zweischichtige Polymermembran [162], deren Dicke einige hundert Nanometer bis fast 100µm betragen kann und die bei der untersuchten Spezies *Citrus Aurantium* etwa 3µm dick ist [163]. Die äußere Schicht besteht fast ausschließlich aus Cutin, einem dreidimensionalen Polymer, das selbst in organischen Lösungsmitteln unlöslich ist. Die innere Schicht, die auch mit den Epidermiszellen interagiert, besteht neben Cutin aus Polysacchariden wie z. B. Zellulose und anderen polaren Polymeren. In die Cutin-Matrix sind wachsartige Substanzen eingebettet, die sogenannten löslichen cuticularen Lipide (Soluble Cuticular Lipids, SCL), die sich in Chloroform und anderen organischen Lösungsmitteln lösen. SCL bestehen aus gesättigten Alkanen (C16-C35), Alkoholen, Aldehyden, -Diketonen, Fettsäuren und Triterpenen [164]. Die Wachskristalle bilden an den Außenseiten der Blätter keine durchgängige Schicht, sondern formen kristalline Wachsinseln, die die Oberfläche stark hydrophob machen.

Man vermutet, daß es zwischen den Wachsinseln Defekte von etwa 1nm Größe gibt, die sich mit Wasser füllen können und so einen langsamen Wassertransport ermöglichen [165]. Die gemessenen Wasserpermeabilitäten sind unterschiedlich, aber für Angiospermblatt-Cuticula im Mittel nicht größer als 80µm/s [163].

Ziel der hier vorgestellten Messungen war es, neue Informationen über das Quellverhalten der Cuticula zu erhalten, um daraus Rückschlüsse auf die Diffusionsraten von Wasser durch die innere und äußere Schicht zu ziehen. Dazu wurden getrocknete Cuticula-Proben unterschiedlich lange in destilliertem Wasser gelagert und danach mit dem AFM im Force-Mapping-Modus untersucht.

8.1 Untersuchung der Struktur

Beim Abbilden der Cuticula-Proben in Luft wurden verschiedene Strukturen beobachtet. Die Außenseite (Abbildung 8.1a) ist bedeckt von zahlreichen runden Inseln mit Durchmessern von etwa 2-10 μm und Höhen zwischen 90 und 130nm, die aus einem sehr hydrophoben Material bestehen. Kontaktwinkelmessungen ergaben hier Werte zwischen 105° und 110°. Diese Inseln enthalten wahrscheinlich die wachsartigen Substanzen (SCL) oder stellen sogar die kristalline Form dieser Wachse dar.

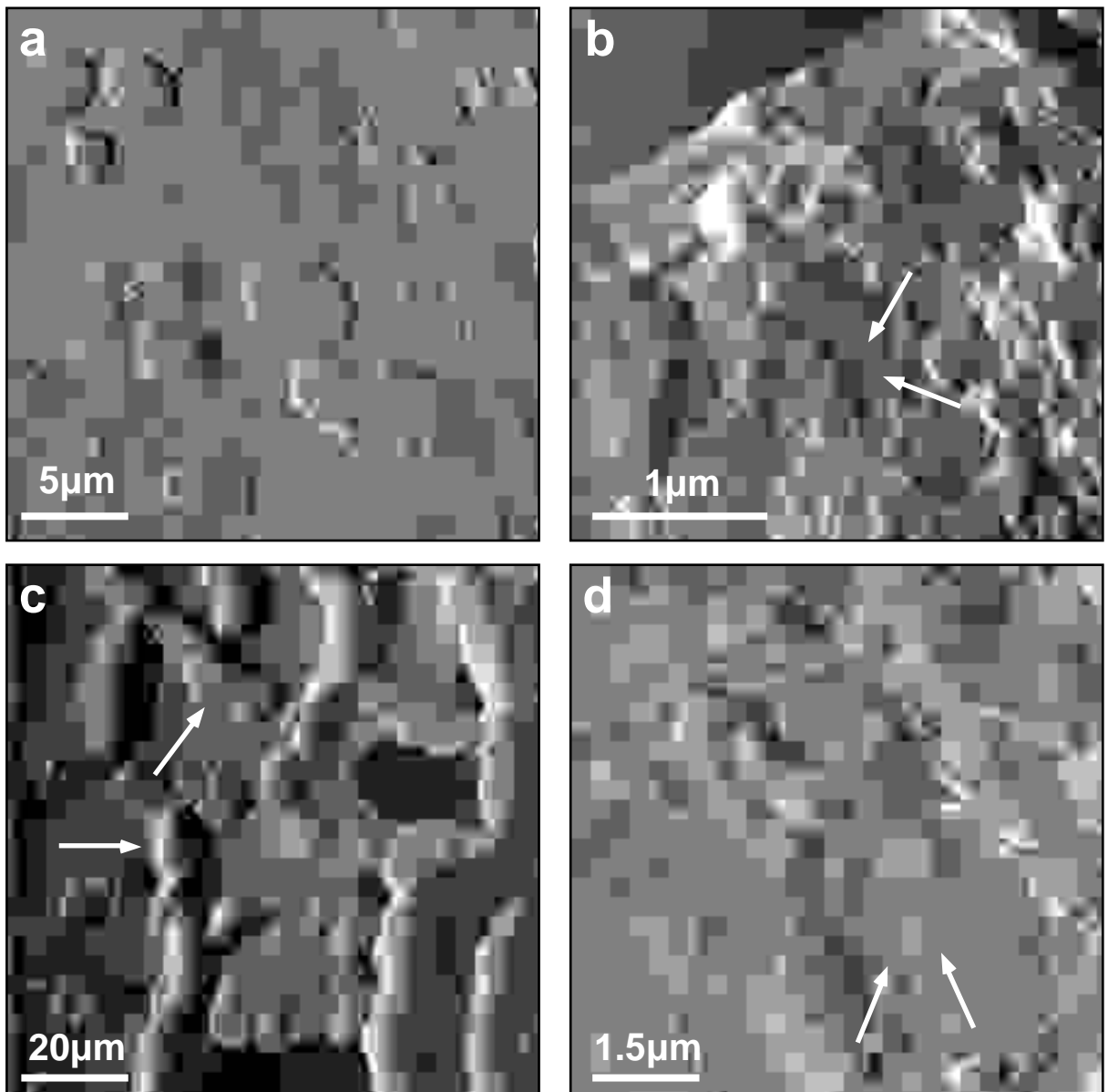


Abbildung 8.1: Auslenkungsbilder einer Cuticula-Probe von *Citrus Aurantium*, aufgenommen in Luft. (a) Flache Inseln auf der stark hydrophoben Außenseite. Vermutlich handelt es sich um wachsartige Substanzen (SCL). (b) Unter den mit hoher Auflagekraft weggekratzten Wachsin-seln befindet sich ein Netzwerk aus 50nm dicken Filamenten (Pfeile). (c) Zwischen den 3-4 μm hohen Stegen auf der Innenseite (Pfeile) ist bei der lebenden Pflanze je eine Epidermiszelle eingebettet. (d) Unter der Oberfläche findet man ähnliche Filamente wie in (b).

Beim Abbilden mit sehr hohen Auflagekräften im Bereich von einigen hundert Nanonewton werden die Inseln zerstört und darunterliegende filamentäre Strukturen mit Durchmessern von etwa $50\mu\text{m}$ kommen zum Vorschein (Pfeile in b).

In der lebenden Pflanze befindet sich direkt unterhalb der Cuticula eine Schicht von Epidermiszellen. Durch $3\text{--}4\mu\text{m}$ hohe Stege (Pfeile in Abbildung 8.1c) ist die Innenseite der Cuticula in Segmente aufgeteilt, in die die Oberseite jeweils einer Epidermiszelle eingebettet ist. Die Oberflächenstruktur zwischen den Stegen unterscheidet sich von der Struktur auf der Außenseite. Hier ist das filamentäre Netzwerk nur von einer dünnen Schicht bedeckt, die schon mit Auflagekräften von etwa 100nN entfernt werden kann. Die freigelegten Filamente haben Durchmesser von 50nm und ähneln auf der Längenskala der Abbildung den Strukturen unterhalb der äußeren Wachsschicht.

8.2 Elastizitätsmessungen

Da die Probe mit $1\text{--}10\text{GPa}$ sehr hart ist, mußten für die Elastizitätsmessungen Cantilever mit sehr hohen Federkonstanten von 70N/m verwendet werden (DI-TESP, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA). Dadurch werden das thermische Rauschen und der Einfluß hydromechanischer Kräfte bei den Experimenten in Wasser (siehe Kapitel 3.1.4) minimiert, so daß die Auswertung der Kraftkurven in einem niedrigen Fitbereich ($10\text{--}30\text{nm}$) durchgeführt werden konnte. Die maximale Eindrückung beträgt dann 90nm bei einer Probenelastizität von 1GPa , wie sie für die Innenseite der Cuticula typisch ist und ist auf der härteren Außenseite noch geringer. Da die Eindrückungen damit deutlich kleiner sind als die Dicken der inneren und äußeren Cuticula-Schicht, ist gewährleistet, daß tatsächlich nur die elastischen Eigenschaften der jeweils oben liegenden Schicht gemessen werden.

Abbildung 8.2 zeigt die Ergebnisse von Force-Mapping-Experimenten, in denen unterschiedlich lange in Wasser gequollene Proben der äußeren Cuticula-Schicht von *Citrus Aurantium* untersucht wurden. Die Oberfläche der trockenen Cuticula (a,b) erscheint im Höhenbild (a) sehr glatt. Topographische Strukturen liegen im Sub- μm -Bereich. Der Kontrast zwischen rechtem und linkem Bildrand ist auf eine Neigung der gesamten Probe zurückzuführen. Im Elastizitätsbild (b) sind keine Strukturen erkennbar.

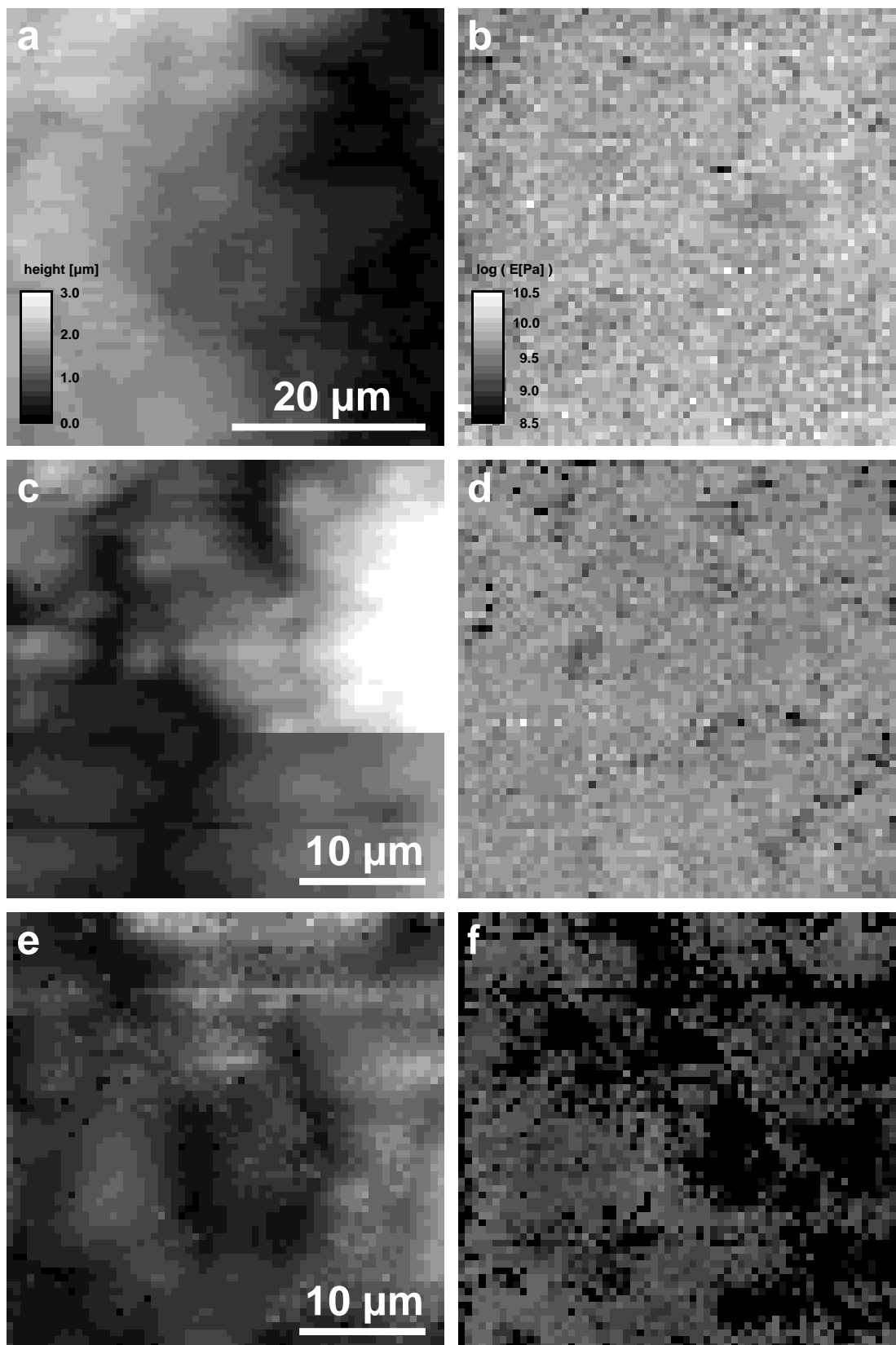


Abbildung 8.2. Außenseite einer getrockneten Cuticula-Probe, untersucht in Luft (a,b) und nach 30-minütigem (c,d) bzw. 30-stündigem (e,f) Quellen in deionisiertem Wasser. (a,c,e) Reale Höhenbilder. (b,d,f) Elastizitätsbilder.

Im Vergleich zeigt das Höhenbild einer Cuticula-Probe, die 10min vor Beginn der Messung in deionisiertes Wasser gelegt worden war (c), deutlicher ausgeprägte Strukturen von etwa $2\mu\text{m}$ Höhe. Auch hier sind diese Strukturen im Elastizitätsbild (d) nicht erkennbar. Ein Vergleich mit dem Elastizitätsbild der trockenen Cuticula macht bereits deutlich, daß die Probe durch das Quellen deutlich weicher geworden ist.

Nach 30-stündigem Quellen erscheint die Topographie der Probe kaum verändert (e). Allerdings treten auf 10-20% der Oberfläche Bereiche von einigen μm Durchmesser auf, in denen die Annäherungs- und Wegfahr-Teile der Kraftkurven sehr unterschiedliche Anstiege aufweisen und weit auseinander liegen (dunkle Gebiete in (f)). Dieser Verlauf der Kraftkurven könnte z. B. darauf zurückzuführen sein, daß die Probe plastisch verformt wird. Die berechneten Werte der Elastizitätsmoduli haben hier keine physikalische Relevanz, da das Hertz-Modell, das zur Analyse der Kraftkurven angewandt wurde, nur rein elastische Eindrücke beschreibt.

Die Ergebnisse der Elastizitätsmessungen an der Innenseite einer 30min in Wasser gequollenen Cuticula-Probe sind in Abbildung 8.3 dargestellt. Das Höhenbild (a) zeigt wieder die bereits aus Abbildung 8.1c bekannten Stege. Im Elastizitätsbild (b) erscheinen die Stege weicher als die Umgebung. An den Stegrändern handelt es sich dabei um ein Artefakt, das dadurch entsteht, daß die pyramidenförmige AFM-Spitze beim Annähern seitlich am Steg entlanggleitet und diesen beiseite schiebt. Dabei ergeben sich sehr flache Kraftkurven und folglich werden sehr niedrige Elastizitätsmoduli berechnet. Trifft die AFM-Spitze den Steg zentral, so daß dieser nicht

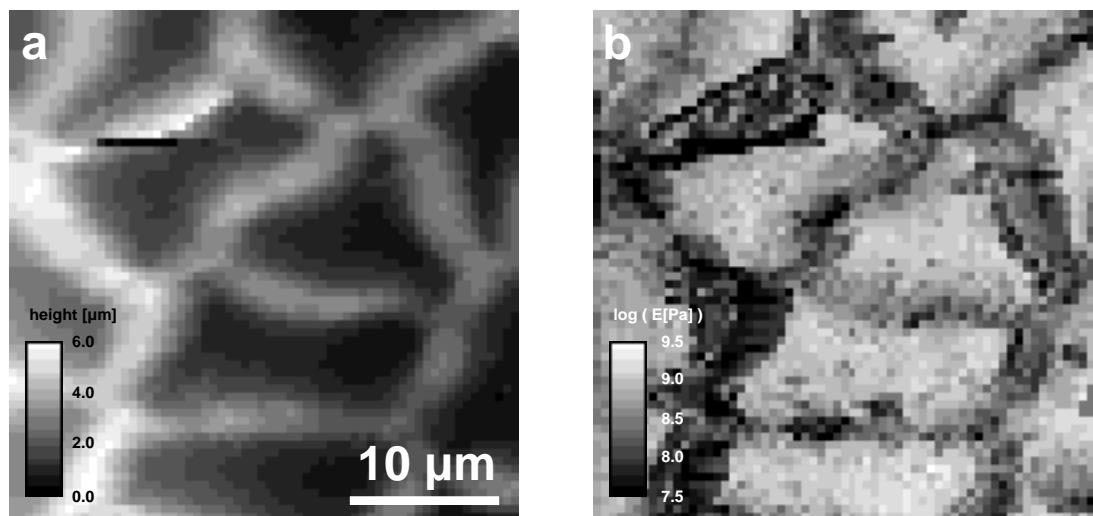


Abbildung 8.3: Innenseite einer Cuticula-Probe nach 30-minütigem Quellen in destilliertem Wasser. (a) Reales Höhenbild. (b) Elastizitätsbild.

zur Seite ausweichen kann, dann wird der Steg vertikal komprimiert und dehnt sich senkrecht zur angelegten Kraft, also in horizontaler Richtung aus. Im Falle des schmalen Steges wirkt dieser Ausdehnung keine vom umgebenden elastischen Material ausgeübte Kraft entgegen. Die Kompression erfordert also eine geringere Auflagekraft, d. h. allgemein ist der Elastizitätsmodul eines schmalen Steges geringer als der Elastizitätsmodul einer ausgedehnten Probe, die aus demselben Material besteht.

Von J. Domke durchgeführte Finite-Elemente-Simulationen des Eindrückvorgangs zeigen, daß auf den Stegen Elastizitätsmoduli gemessen werden können, die eine Größenordnung kleiner sind, als der Elastizitätsmodul eines Halbraums, der aus dem selben Material besteht. Der Elastizitätskontrast zwischen den Stegen und den dazwischen liegenden Bereichen in Abbildung 8.3 ist also nicht notwendigerweise auf unterschiedliche Materialeigenschaften zurückzuführen.

8.3 Das Quellverhalten

Mit Hilfe der in Abbildung 8.4 dargestellten Elastizitätshistogramme kann das Quellverhalten der Cuticula quantitativ analysiert werden.

Die Histogramme in Abbildung 8.4a und b veranschaulichen die homogene Verteilung der Young-Moduli auf der Außenseite der trockenen bzw. nur 30min lang gequollenen Cuticula. Das schärfere Maximum in der Elastizitätsverteilung in (b) ist darauf zurückzuführen, daß der Fehler, der bei der Auswertung durch ungenaue Bestimmung der Steigung der Referenz-Kraftkurve entsteht (vgl. Kapitel 3.3.4), auf weicheren Proben geringer ist [52]

Auf der Außenseite der trockenen Cuticula (a) liegen die Elastizitätsmoduli zwischen 3GPa und 10GPa. Das Maximum der Verteilung befindet sich etwa bei 7GPa. Bereits nach 30-minütigem Quellen ist die Verteilung der Elastizitätsmoduli im Histogramm (b) nach links verschoben und man findet Werte zwischen 2GPa und 6GPa mit einem Maximum bei 4GPa. Durch das Quellen ist die Cuticula also etwa um den Faktor 2 weicher geworden. Während der 20 Minuten, in denen die zugehörige Force Map aufgenommen wurde (Abbildung 8.2d, zeilenweise von unten nach oben), ändern sich die Elastizitätsmoduli kaum noch. Nach 30-stündigem Quellen werden jedoch noch geringere mittlere Elastizitätsmoduli im Bereich von 1,5GPa gemessen (Abbildung 8.4c). Das Wasser diffundiert also innerhalb der ersten 10min sehr

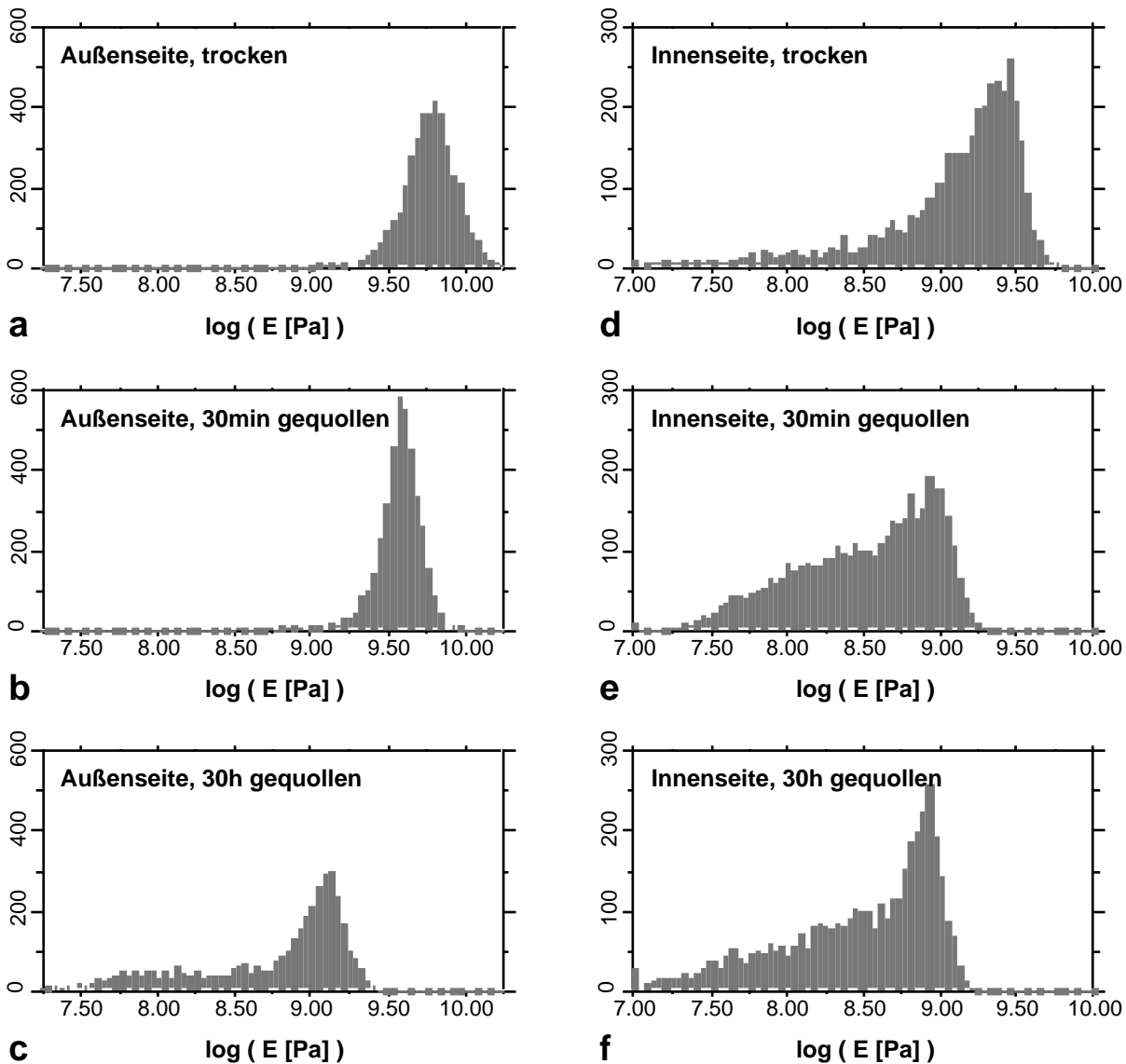


Abbildung 8.4: Elastizitätshistogramme der inneren (a-c) und äußeren (d-f) Schicht der Cuticula. (a,d) Getrocknete Probe. (B,e) Nach 30-minütigem Quellen in deionisiertem Wasser. (C,f) Nach 30-stündigem Quellen.

schnell in die äußere Schicht der Cuticula. Danach setzt sich der Quellvorgang auf einer wesentlich langsameren Zeitskala fort.

Für die Innenseite der Cuticula ergibt sich aufgrund der unterschiedlichen Elastizitätsmoduli, die auf den Stegen bzw. in den Zwischenräumen gemessen werden, eine breite Verteilung der Werte in den Elastizitätshistogrammen (Abbildung 8.4d-f). Auf der getrockneten Probe (d) liegt das Maximum dieser Verteilung bei 2GPa und entspricht dem mittleren Wert des Elastizitätsmoduls der zwischen den Stegen gelegenen Bereiche. Die Innenseite der Cuticula ist also deutlich weicher als die Außenseite. Nach 30-minütigem Quellen in deionisiertem Wasser beträgt der mittlere Ela-

stizitätsmodul auf der Innenseite nur noch etwa 1GPa. Auf einer 30h lang gequollenen Probe werden immer noch Elastizitäten von 1GPa gemessen. Der Quellvorgang ist auf der Innenseite also nach 30min abgeschlossen.

Die Elastizitätsmoduli sowohl der inneren als auch der äußeren Schicht der Cuticula hängen also von der Inkubationszeit in Wasser ab. Aus den beobachteten Unterschieden in der Zeitabhängigkeit kann man schließen, daß die Diffusion von Wasser in beide Schichten auf unterschiedlichen Zeitskalen stattfindet. Auf der Innenseite ist eine Sättigung bereits innerhalb der ersten 30min erreicht, während auf der Außenseite zwar ebenfalls anfangs ein schnelles Quellen beobachtet wird, aber auch über mehrere Stunden hinweg noch Veränderungen auftreten. Insbesondere verändern sich die elastischen Eigenschaften der Außenseite nach längerer Inkubationszeit qualitativ, was darauf zurückzuführen sein könnte, daß Bestandteile der Cuticula in Lösung gehen.

9. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Force Mapping als Technik etabliert, die es erlaubt, Elastizitätsmoduli lebender Zellen mit lateralen Auflösungen unterhalb von 100nm zu messen. Zunächst wurden zelluläre Strukturen identifiziert, die in den Elastizitätsbildern, aber auch in AFM-Bildern lebender Zellen auftreten. Zahlreiche Experimente an Zellen, aber auch an einfacheren Modellsystemen [59] dienten dazu, die Methode hinsichtlich Genauigkeit und Anwendbarkeit auf verschiedene experimentelle Situationen zu charakterisieren. Durch gezielte Manipulationen am Zytoskelett lebender Zellen ist es gelungen, nachzuweisen, daß das Aktinnetzwerk die mechanischen Eigenschaften der Zellen und damit die gemessenen Elastizitätsmoduli bestimmt. Daraufhin konnte begonnen werden, biologisch relevante Prozesse zu untersuchen, bei denen das Aktinnetzwerk eine entscheidende Rolle spielt.

Ein vielversprechender Ansatz hierbei waren die Untersuchungen an kriechenden Zellen, die es im Fall der 3T3-Fibroblasten ermöglichten, Aussagen über den Mechanismus der Bewegung dieses Zelltyps zu treffen. Daraus ergeben sich unmittelbar Perspektiven für weiterführende Experimente. So können z. B. wichtige Informationen über die Ausbreitung von Krebs durch Metastasen, über die Morphogenese oder über Funktionsweisen des Immunsystems gewonnen werden, wenn geklärt werden kann, wie die dafür nötigen Bewegungen und Formveränderungen der jeweiligen Zellen ablaufen. Methodisch interessant wäre es auch, Zellen zu untersuchen, von denen man weiß, daß sie sich auf eine andere Weise fortbewegen als die bereits untersuchten 3T3-Fibroblasten. Durch chemische oder genetische Manipulationen ist es auch möglich, die Art und Weise des Kriechens zu verändern (z. B. chemisch angeregtes Blebbing) oder die Richtung der Bewegung vorzugeben (Chemotaxis).

Modellvorstellungen über das Kriechen von Zellen umfassen auch Mechanismen, die auf der Regulierung des Zellvolumens und den damit verbundenen Druckänderungen basieren. Da durch die Auswertung von Force Maps auch Informationen über die reale Höhe der Probe gewonnen werden können, eignet sich die Methode auch zur Volumenmessung, die zur Untersuchung solcher Kriechvorgänge eingesetzt werden kann.

Im Unterschied zu optischen Techniken bieten Elastizitätsbilder einen Kontrastmechanismus, der es ermöglicht, zwischen Zelle und Unterlage zu unterscheiden. Damit kann z. B. experimentell geprüft werden, ob der Entzug von Mg^{2+} -Ionen die Bildung

von Löchern in der Endothelzellschicht von Blutgefäßen zur Folge hat - ein Effekt, der zur Entstehung von Herzinfarkten führen kann.

Eine Anzahl weiterer interessanter Projekte ergibt sich bei der Untersuchung der Zellteilung. Hier ist z. B. noch ungeklärt, wie es zur Einschnürung der Zellen kommt. Dieser Prozeß könnte aktiv durch den kontraktilen Ring aus Aktinfilamenten oder passiv durch Verringerung der Zugspannung an den Polen der Zelle gesteuert sein. Der kontraktile Ring kann direkt untersucht werden. Informationen über die Zugspannung im Kortex der Zelle kann man aus der über Elastizitätsmoduli meßbaren kortikalen Steifheit ableiten.

Die Messung elastischer Eigenschaften auf kleinster Skala ist natürlich nicht nur in der Zellbiologie, sondern auch in der Werkstoffkunde von Interesse. Ein Thema, das diese beiden Gebiete überspannt, ist die Untersuchung natürlicher Verbundwerkstoffe wie z. B. Knochen. Die Eigenschaften der Apatitkristalle, die den Knochen bilden, sind noch weitgehend unbekannt, und auch bezüglich der Bildung der Knochenmatrix gibt es noch viele offene Fragen.

Anhang

A.1 Zellkultur

Soweit nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Chemikalien und Lösungen bei Sigma (Deisenhofen) gekauft.

A.1.1 Hühnerherzzellen

Ziel der hier beschriebenen Präparation ist die Gewinnung pulsender Myozyten aus den Herzen angebrüteter Hühnereier. Die Methode war jedoch zum Zeitpunkt der beschriebenen Experimente noch nicht ausgereift und lieferte eine etwa neunzigprozentige „Verunreinigung“ mit Fibroblasten, so daß davon ausgegangen werden muß, daß es sich bei den untersuchten Zellen um Fibroblasten handelt. Hier wird die tatsächlich durchgeführte Präparation beschrieben. Eine mittlerweile eingesetzte verbesserte Methode ist nachzulesen z. B. bei Domke *et al.* [166].

Die Hühnerherzzellen werden aus 7-9 Tage alten angebrüteten Eiern präpariert (Ross 208 Hühnerembryos, Brüterei Hoelzl, Moosburg). Die Entnahme der Herzen erfolgt unter sterilen Bedingungen in eiskalter Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). 10-15 Herzen werden von umgebendem Gewebe befreit, 10min lang in eiskalte Fungizone-Lösung (Gibco über Life-Technologies, Eggenstein) (1:5 in HBSS) gelegt, in 1mm große Stücke geteilt und über Nacht in eiskalter Trypsin-Lösung gelagert. Am nächsten Tag wird der kurz erwärmten Lösung ein Trypsin-Inhibitor zugegeben. Diese Lösung wird nun etwa eine Minute lang mit sterilem Sauerstoff begast. Nach Zugabe von Kollagenase werden die Behälter vorsichtig eine Stunde lang im 37°C warmen Wasserbad geschwenkt. Diese Mischung wird nun mit einem 70µm Sterilfilter filtriert. Durch Verdünnung mit Hepes-gepuffertem Zellmedium 818A [167] (bestehend aus 25% M 199 Medium, 2% fötalem Kälberserum (fetal Bovine Serum, FBS), 0,5% Gentamicin und einer Salzlösung mit 116mM NaCl, 0,6mM MgSO_4 , 0,9mM NaH_2PO_4 , 1,8mM CaCl_2 , 26,6mM NaHCO_3 , 1,3mM KCl, 5,5mM Dextrose und 25mM Hepes bei pH 7,2) kommt die enzymatische Reaktion zum Stillstand. Die resultierenden einzelnen Hühnerherzzellen werden mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5/\text{ml}$ in CellTak-beschichtete 35mm Nunclon-Petrischalen (Nunclon, Naperville, USA) bei einem Füllstand von 3mm ausgesät. Die Beschichtung der Petrischalen mit CellTak (Becton-Dickinson über Labor-Schuberth, München) erfolgt

vorher durch zweistündiges Einwirken einer Lösung von 10µg/ml in HBSS. Nach zweimaligem Spülen mit reinem HBSS werden die Petrischalen direkt verwendet.

Vor dem AFM-Experiment werden die Hühnerherzzellen für mindestens 48h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in der Luft gelagert, damit sie fest an den Boden der Petrischale adhärieren können.

Alle verwendeten Enzyme wurden dem „Neonatal Rat Cardiocytes Isolation System“ der Firma Worthington Biochemicals entnommen (gekauft bei Cell Systems, Remagen) und, sofern nicht anders angegeben, in HBSS gelöst.

A.1.2 3T3- und NRK-Fibroblasten

3T3- und NRK-Fibroblasten werden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert, dem 10% FBS (beides von Sigma, Deisenhofen oder Biochrom KG, München) und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (P/S) (1000units/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycinsulfat in 0,9% NaCl) (Gibco, über Life-Technologies, Eggenstein) zugegeben werden. Die NRK-Fibroblasten benötigen zusätzlich nichtessentielle Aminosäuren (Biochrom KG, München) Für die AFM-Messungen werden die Zellen 1-3 Tage vor dem Experiment in 35mm Nunclon-Petrischalen (Nunclon, Naperville, USA) ausgesät und im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt.

Das Aussäen der Zellen in die Petrischalen kann parallel zum Passagieren erfolgen. Darunter versteht man das Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß und das anschließende Wiederaussäen mit geringerer Dichte. Passagieren verhindert unkontrolliertes Zellwachstum in den Kulturgefäßen und ist etwa ein- bis zweimal pro Woche nötig, wenn die Zellen eine konfluente Schicht bilden, d. h. den Boden des Kulturgefäßes vollständig bedecken. Beim Passagieren wird zunächst das alte Medium aus dem Gefäß gesaugt. Mit 0,25% Trypsin/EDTA (3T3) (2,5g/l Trypsin und 0,2g/l EDTA+Na⁺ in HBSS) bzw. 0,25% Trypsin (NRK) (2,5g/l Porcine Trypsin in HBSS) wird dann zweimal der Gefäßboden gespült. Danach läßt man möglichst wenig Trypsin/EDTA (Füllhöhe <1mm) etwa 10min lang einwirken, bis sich die Zellen von der Unterlage lösen. Der Vorgang kann beschleunigt werden, indem das Kulturgefäß wieder in den Brutschrank gestellt wird. Nachdem noch am Boden haftende Zellen durch vorsichtiges Schütteln oder Klopfen abgelöst wurden, werden etwa 5ml Medium zugegeben. Diese Zellsuspension wird nun, um verbliebene Zellklumpen aufzubrechen, mehrmals mit der Pipette angesaugt und z. B. gegen die Innenwand der Kulturflasche

gespritzt. Zum Aussäen wird je nach gewünschter Zelldichte etwa 1 Tropfen der Lösung in eine 35mm Petrischale mit 2ml Zellmedium gegeben. Für eine kleine Kulturflasche mit 5ml Medium benötigt man ca. 0,3ml der Lösung.

A.1.3 Kupfferzellen und Leberendothelzellen

Die Präparation dieser Zellen ist relativ aufwendig und wurde von unserem Kooperationspartner Filip Braet aus dem Labor für Zellbiologie und Histologie der Freien Universität Brüssel durchgeführt. Die verwendete Methode ist eine Modifikation des von Smedsrød *et al.* entwickelten Verfahrens [168] und wurde detailliert von Braet *et al.* beschrieben [169]. Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Kupfferzellen erfolgte die Präparation nach einem ebenfalls von Braet *et al.* vorgestellten Protokoll [91].

A.1.4 Keratocyten

Für die Präparation der Keratocyten werden zwei möglichst unterschiedlich große Deckgläschen benötigt, die zunächst mindestens 15min lang in Ethanol gereinigt und danach abgeflammt werden.

Die Zellen werden aus einzelnen Goldfischschuppen präpariert. Eine große Petrischale, die mit Eis und Wasser gefüllt und mit Serafilm überzogen wird, dient als Operationstisch. Durch das Eis wird der Fisch betäubt. Der Fisch wird auf die gekühlte Unterlage gelegt und an der Schwanzflosse festgehalten. Mit einer feinen abgerundeten Pinzette können auf jeder Seite 3-4 Schuppen an verschiedenen Stellen, aber nicht von der empfindlichen Seitenlinie vorsichtig entnommen werden. Danach (nach höchstens 1-2min) sollte der Fisch schnellstmöglich wieder ins Aquarium gebracht werden. Die Schuppen werden dann dreimal je 5min lang in verschiedenen Petrischalen in 2ml einer Lösung aus RPMI-Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Fungizone gewaschen. Je zwei Schuppen werden nun auf die Mitte eines der größeren Deckgläschen gelegt, das vorher in eine 35mm Petrischale gelegt wurde und vorsichtig mit dem kleineren Deckgläschen bedeckt. Ein Tropfen der RPMI-Lösung wird nun seitlich nahe der Kante des Deckgläschens zugegeben und gelangt durch Kapillarkraft in das entstandene Sandwich. Trocknen die Zellen aus oder wird das obere Deckgläschen durch zu reichliche Zu-

gabe von Medium weggespült, erhält man keine Zellen. Die Petrischalen werden nun, um ein Austrocknen zu vermeiden, über Nacht zusammen mit wassergetränkten Labortüchern (z. B. Kimwipes; destilliertes Wasser verwenden) in einer großen Petrischale o. ä. aufbewahrt, die mit Serafilm abgedichtet wird. Die Aufbewahrung erfolgt bei Raumtemperatur, ohne CO₂ und möglichst im Dunklen.

Am nächsten Tag wird das obere Deckgläschen durch Zugabe einiger Tropfen PBS+ (Phosphate Buffered Saline mit Ca²⁺ und Mg²⁺) vorsichtig abgelöst und umgedreht, so daß man zwei Proben erhält. Überschüssiges Medium wird durch Spülen mit PBS+ entfernt. Danach wird PBS mit Ca²⁺, aber ohne Mg²⁺ zugegeben. Innerhalb von 10min runden sich die Zellen und lösen sich voneinander, aber nicht vom Deckgläschen. Nun wird die Probe noch einmal mit PBS+ gewaschen und danach in RPMI aufbewahrt. Nach etwa 1h adhäreren die Zellen wieder gut und beginnen zu kriechen.

A.1.5 MTLn3-Zellen

MTLn3-Zellen werden in -MEM mit 5% FBS (Sigma, Deisenhofen oder Biochrom KG, München) und 1% P/S (Gibco, über Life-Technologies, Eggenstein) bei pH 7,4 kultiviert. Die Prozedur ist ansonsten analog zur Fibroblasten-Kultur.

Beim Passagieren wird zunächst einmal mit PBS gespült. Danach werden die Zellen mit 0,25% Trypsin/EDTA von der Unterlage gelöst und in neue Petrischalen und Zellkulturflaschen ausgesät (siehe A.1.2).

Vor dem EGF-Experiment müssen die Zellen etwa 3h lang ausgehungert werden. Dazu wird Starvation-Medium verwendet, das 35% FBS und 12mM Hepes-Puffer in -MEM enthält.

A.1.6 Cuticula

Cuticula-Proben können aus der adaxialen Blattoberfläche von *Citrus Aurantium* isoliert werden. Dazu stanzt man vorsichtig kleine Scheiben aus den Blättern und inkubiert diese bei 37°C in einer Lösung aus 4% Pectinase, 4% Cellulase (Roth, Karlsruhe) und 2mM Natrium-Azid, die auf pH 4,0 eingestellt wird [170]. Nach einer Woche werden die cuticularen Membranen (CM) von der Epidermis abgetrennt und durch gründliches Spülen mit Wasser von Zellresten befreit. Die Konversion der

Cuticula in die H⁺-Form erfolgt durch 10-minütige Inkubation in 1M HCl. Danach werden die CMs mit deionisiertem Wasser gespült und luftgetrocknet.

Für die AFM-Experimente wurden die CMs mit doppelseitigem Klebeband am Boden von 35mm Petrischalen befestigt, die danach mit deionisiertem Wasser gefüllt wurden.

A.2 Zugabe von Wirkstoffen

Um den Einfluß der verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts auf die Elastizität lebender Zellen zu untersuchen, wurden Wirkstoffe verwendet, die diese Strukturen zerstören oder stabilisieren (Cytochalasin B und D, Phalloidin, Taxol, Colchicin (alle von Sigma, Deisenhofen), Latrunculin A und Jasplakinolide (zur Verfügung gestellt von Ilan Spector)). Von allen Wirkstoffen wurden Stammlösungen mit dem 10-20-fachen der Arbeitskonzentration erzeugt, indem die Drogen zunächst in DMSO gelöst und dann mit DMEM oder PBS verdünnt wurden. Für die Experimente wurden die Petrischalen mit je 1,8-1,9ml Zellmedium gefüllt, so daß durch Zugabe von 100-200µl der Stammlösung die benötigte Konzentration erhalten werden konnte. Um die Verzögerung des Drogeneffekts zu vermeiden, die dadurch entsteht, daß der Wirkstoff erst bis zur Zelle diffundieren muß, wurde das Medium in einigen Fällen auch vollständig durch frisches Medium ausgetauscht, das den Wirkstoff bereits in der Arbeitskonzentration enthielt. Alternativ wurde auch nach Zugabe der Stammlösung die Hälfte des Mediums mehrfach mit einer Pipette abgesaugt und wieder zugegeben, um eine schnellere Durchmischung zu erreichen.

A.3 Fluoreszenz

Nach Entfernen des Zellmediums wird die Petrischale zunächst 3x mit PBS gespült. Dann werden die Zellen in einer Lösung aus 10% Glutaraldehyd in PBS 10min lang fixiert, 3x mit PBS gespült, 3min lang in einer Lösung aus 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und wieder 3x mit PBS gespült. Um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern, müssen die folgenden Schritte in einem möglichst dunklen Raum durchgeführt werden. Je nach Ausgeprägtheit des Zytoskeletts werden die Zellen in einer 1:200 Lösung aus Rhodamin-Phalloidin in PBS bei Raumtemperatur 20min-2h lang inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wird durch nochmaliges dreifaches Spülen

mit PBS entfernt. Die Petrischalen können danach in Alufolie o. ä. eingewickelt und mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera (Visicam, Visitron München) aufgenommen, die an ein invertiertes optisches Mikroskop (Axiovert, Zeiss, Oberkochen) montiert war.

A.4 Präparation der Lipidpatches

Die Glimmerplättchen wurden mit Hilfe eines Stecheisens aus Glimmerscheiben ausgestanzt und mit 2-Komponenten-Kleber (Bindulin) auf Stahlplättchen geklebt, die direkt magnetisch am Piezo des Nanoscopes befestigt werden können. Vor der Präparation der Lipidpatches muß eine saubere, glatte Glimmeroberfläche erzeugt werden, indem die oberste Glimmerschicht mit Klebeband abgezogen wird.

Eine Vesikelsuspension des Lipids DODAB (Dimethyldioktadekylammoniumbromid) (Fluka, Buchs, Schweiz) wird wie folgt hergestellt: 0,5mg DODAB-Pulver werden in 0,5ml Chloroform (HPLC-Grade, Sigma, Deisenhofen) gelöst und eingetrocknet. Die Substanz wird danach wieder in destilliertem Wasser gelöst (Milli-Q-Qualität, Millipore Systems, Molsheim, Frankreich), so daß sich eine Konzentration von 5µg/ml ergibt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 30min bei 55°C kann die durchschnittliche Vesikelgröße reduziert werden, indem die Lösung einige Sekunden lang im Tip-Sonicator (Bandelin, Berlin) mit Ultraschall behandelt wird. Nun werden 100-200µl der Lösung auf ein frisch gespaltenes Glimmerplättchen pipettiert und mindestens 5min lang inkubiert. Vor dem Einbau der Probe in das AFM wird die verbleibende Vesikellösung mit Hilfe einer Pasteurpipette durch mehrfaches Spülen mit Millipore-Wasser entfernt, wobei darauf zu achten ist, daß die Probe kontinuierlich mit Flüssigkeit bedeckt bleibt. Diese Präparation liefert kleine Patches von DODAB-Doppelschichten, die 5nm hoch sind (doppelte Länge des DODAB-Moleküls).

A.5 Verzeichnis der Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope)
SEM	Rasterelektronenmikroskop (Scanning Electron Microscope)
SFA	Surface Force Apparatus
DODAB	Dimethyldioktadekylammoniumbromid

EGF	Epidermal Growth Factor
CM	cuticulare Membran
DMSO	Dimethylsulfoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS+	Phosphate Buffered Saline mit Ca^{2+} und Mg^{2+}
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	fötales Kälberserum (fetal bovine serum)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PMMA	Polymethylmethacrylat (Plexiglas)

Literaturverzeichnis

1. Binnig, G., Rohrer, H., *Scanning tunneling microscope*, Helv. Phys. Acta, 1982, **55**, 726-735.
2. Wickramasinghe, H. K., *Scanning probe microscopy. Current status and future trends*, J. Vac. Sci. Technol. A, 1990, **8**, (1), 363-369.
3. Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C., *Atomic force microscope*, Phys. Rev. Lett., 1986, **56**, (9), 930-933.
4. Tillmann, R. W., Radmacher, M., Gaub, H. E., *Surface structure of hydrated amorphous silicon oxide at 3 Å resolution by scanning force microscopy*, Appl. Phys. Lett., 1992, **60**, (25), 3111-3113.
5. Ohnesorge, F., Binnig, G., *True Atomic Resolution by Atomic Force Microscopy via Repulsive and Attractive Forces*, Science, 1993, **260**, 1451-1456.
6. Shao, Z., Yang, J., *Progress in high resolution atomic force microscopy in biology*, Quarterly Reviews of Biophysics, 1995, **28**, (2), 195-251.
7. Radmacher, M., Tillmann, R. W., Fritz, M., Gaub, H. E., *From molecules to cells - imaging soft samples with the AFM*, Science, 1992, **257**, 1900-1905.
8. Radmacher, M., Fritz, M., Hansma, H. G., Hansma, P. K., *Direct observation of enzyme activity with the atomic force microscope*, Science, 1994, **265**, 1577-1579.
9. Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C. M., Cleveland, J. P., Hansma, P. K., *Measuring the elastic properties of human platelets with the atomic force microscope*, Biophys. J., 1996, **70**, (1), 556-567.
10. Rief, M., Oesterheld, F., Berthold, M., Gaub, H. E., *Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy*, Science, 1997, **275**, 1295-1297.
11. Tao, N. J., Lindsay, N. M., Lees, S., *Measuring the microelastic properties of biological material*, Biophys. J., 1992, **63**, 1165-1169.
12. Radmacher, M., Cleveland, J. P., Fritz, M., Hansma, H. G., Hansma, P. K., *Mapping interaction forces with the atomic force microscope*, Biophys. J., 1994, **66**, (6), 2159-2165.
13. Radmacher, M., *Measuring the elastic properties of biological samples with the atomic force microscopy*, IEEE Eng. in Med. and Biol., 1997, **16**, (2), 47-57.
14. Janmey, P. A., Hvidt, S., Käs, J., Lerche, D., Maggs, A., Sackmann, E., Schliwa, M., Stossel, T. P., *The mechanical properties of actin gels - elastic modulus and filament motion*, J. Biol. Chem., 1994, **269**, (51), 32503-32513.
15. Petersen, N. O., McConnaughey, W. B., Elson, E. L., *Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature and cytochalasin B*, Proc. Nat. Acad. Sci., 1982, **79**, 5327-5331.
16. Lindl, T., Bauer, J., *Zell- und Gewebekultur*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994.
17. Freshney, R. I., *Animal Cell Culture*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1992.

18. Alberts, V. B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing Inc., New York, 1997.
19. Small, J. V., *Lamellipodia architecture: actin filament turnover and the lateral flow of actin filaments during motility*, Seminars in Cell Biol., 1994, **5**, 157-163.
20. Hartwig, J. H., Kwiatkowski, D. J., *Actin-binding proteins*, Curr. Op. Cell Biol., 1991, **3**, 87-97.
21. Henderson, E., Haydon, P. G., Sakaguchi, D. S., *Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy*, Science, 1992, **257**, 1944-1946.
22. Fritz, M., Radmacher, M., Gaub, H. E., *In vitro activation of human platelets triggered and probed by SFM*, Exp. Cell Res., 1993, **205**, (1), 187-190.
23. Fritz, M., Radmacher, M., Gaub, H. E., *Granula motion and membrane spreading during activation of human platelets imaged by atomic force microscopy*, Biophys. J., 1994, **66**, (5), 1328-1334.
24. Schneider, S. W., Sritharan, S. W., Geibel, J. P., Oberleithner, H., Jena, B., *Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: identification of plasma membrane structures involved in exocytosis*, Proc. Nat. Acad. Sci., 1997, **94**, (1), 316-321.
25. Dvorak, J. A., Nagao, E., *Kinetic analysis of the mitotic cycle of living vertebrate cells by atomic force microscopy*, Exp. Cell Res., 1998, **242**, 69-74.
26. Elson, E. L., *Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function*, Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 1988, **17**, 397-430.
27. Bereiter-Hahn, J., Lüers, H., *The role of elasticity in the motile behaviour of cells in Biomechanics of Active Movement and division of cells*; Ed.: N. Akkas, Berlin, 1994; pp. 181-230.
28. Adams, D. S., *Mechanics of cell shape change: the cytomchanics of cellular response to chemical environment and mechanical loading*, J. Cell Biol., 1992, **117**, (1), 83-93.
29. Zahalak, G. I., McConnaughey, W. B., Elson, E. L., *Determination of cellular mechanical properties by cell poking, with an application to leukocytes*, J. Biomech. Eng., 1990, **112**, 283-294.
30. Lüers, H., Hillman, K., Litniewski, J., Bereiter-Hahn, J., *Acoustic microscopy of cultured cells. Distribution of forces and cytoskeletal elements*, Cell Biophys., 1991, **18**, 279-293.
31. Hildebrand, J. A., Rugar, D., *Measurement of cellular elastic properties by acoustic microscopy*, J. Micros., 1984, **134**, (3), 245-260.
32. Discher, D. E., Mohandas, N., Evans, E. A., *Molecular maps of red cell deformation: hidden elasticity and in situ connection*, Science, 1994, **266**, 1032-1035.
33. Evans, E., *Structure and deformation properties of red blood cells: concepts and quantitative methods*, Meth. Enzymol., 1989, **173**, 3-35.

34. Zeman, K., Engelhard, H., Sackmann, E., *Bending undulations and elasticity of the erythrocyte membrane: effects of cell shape and membrane organization*, Europ. Biophys. J., 1990, **18**, 203-219.
35. Ashkin, A., Dziedzic, J. M., *Internal cell manipulation using infrared laser traps*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, **86**, 7914-7918.
36. Svoboda, K., Schmidt, C. F., Branton, D., Block, S. M., *Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton*, Biophys. J., 1992, **63**, 784-793.
37. Hoh, J. H., Schoenenberger, C.-A., *Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy*, J. Cell Sci., 1994, **107**, 1105-1114.
38. Cooper, J. A., *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*, J. Cell Biol., 1987, **105**, (4), 1473-1478.
39. Bray, D., *Cytochalasin action*, Nature, 1979, **282**, 671.
40. Sampath, P., Pollard, T. D., *Effects of cytochalasin, phalloidin and pH on the elongation of actin filaments*, Biochemistry, 1991, **30**, (7), 1973-1980.
41. Stossel, T. P., *On the crawling of animal cells*, Science, 1993, **260**, 1086-1094.
42. Lee, J., Leonard, M., Oliver, T., Ishihara, A., Jacobson, K., *Traction forces generated by locomoting keratocytes*, J. Cell Biol., 1994, **127**, (6), 1957-1964.
43. Lee, J., Ishihara, A., Jacobson, K., *How do cells move along surfaces?*, Trends in Cell Biology, 1993, **3**, 366-370.
44. Putman, C. A. J., van der Werf, K. O., de Grooth, B. G., van Hulst, N. F., Greve, J., Hansma, P. K. in *Proc. SPIE*; 1992, pp. 198-204.
45. Zhong, Q., Innis, D., Kjoller, K., Elings, V., Surf. Sci., 1993, **290**, L688-L692.
46. Florin, E.-L., Moy, V. T., Gaub, H. E., *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs*, Science, 1994, **264**, 415-417.
47. Butt, H.-J., *Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope*, Biophys. Journal, 1991, **60**, 1438 - 1444.
48. Weisenhorn, A. L., Hansma, P. K., Albrecht, T. R., Quate, C. F., *Forces in atomic force microscopy in air and water*, Appl. Phys. Lett., 1989, **54**, 2651-2653.
49. Weisenhorn, A. L., Maivald, P., Butt, H.-J., Hansma, P. K., *Measuring adhesion, attraction, and repulsion between surfaces in liquids with an atomic force microscope*, Phys. Rev. B (Condensed Matter), 1992, **45**, (19), 11226-11232.
50. Hansma, P. K., Drake, B., Grigg, D., Prater, C. B., Yashar, F., Gurley, G., Elings, V., Feinstein, S., Lal, R., *A new, optical lever based atomic force microscope*, J. Appl. Phys., 1994, **76**, (2), 796-799.
51. Butt, H.-J., Jaschke, M., *Thermal noise in atomic force microscopy*, Nanotechnology, 1995, **6**, (1), 1-7.
52. Domke, J., *Untersuchung dünner Polymerfilme mittels Rasterkraftmikroskopie*, Diplomarbeit, LMU München, 1997.

53. Fung, Y. C., *Biomechanics - mechanical properties of living tissues*, Springer, New York, 1993.
54. Morozov, V. N., Morozova, T. Y., *Elasticity of globular proteins. The relation between mechanics, thermodynamics and mobility*, Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 1993, **11**, (3), 459-481.
55. Gray, D. E., *American Institute of Physics Handbook*, McGraw-Hill, New York, 1972.
56. Hertz, H., *Über die Berührung fester elastischer Körper*, J. Reine Angew. Mathematik, 1882, **92**, 156-171.
57. Sneddon, I. N., *The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*, Int. J. Eng. Sci., 1965, **3**, 47-57.
58. Ferry, J. D., *Viscoelastic properties of polymers*, John Wiley & Sons, New York, 1980.
59. Domke, J., Radmacher, M., *Measuring the elastic properties of thin polymeric films with the AFM*, Langmuir, 1998, **14**, (11), 3320-3325.
60. Hoh, J. H., Cleveland, J. P., Prater, C. B., Revel, J. P., Hansma, P. K., *Quantized adhesion detected with the atomic force microscope*, J. Am. Chem. Soc., 1992, **114**, 4917-4918.
61. Butt, H. J., *Electrostatic interaction in atomic force microscopy*, Biophys. J., 1991, **60**, (4), 777-785.
62. Butt, H.-J., *Measuring local surface charge densities in electrolyte solutions with a scanning force microscope*, Biophys. Journal, 1992, **63**, 578 - 582.
63. Ducker, W. A., Xu, Z., Israelachvili, J. N., *Measurements of Hydrophobic and DLVO Forces in Bubble-Surface Interactions in Aqueous Solutions*, Langmuir, 1994, **10**, 3279-3289.
64. Ducker, W. A., Senden, T. J., Pashley, R. M., *Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope*, Nature, 1991, **353**, 239-241.
65. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and surface forces*, Academic Press, New York, 1992.
66. Israelachvili, J. N., Pashley, R. M., *Molecular layering of water at surfaces and origin of repulsive hydration forces*, Nature, 1983, **306**, 249-250.
67. Drummond, C. J., Senden, T. J., *Examination of the geometry of long-range tip sample interaction in atomic force microscopy*, Colloids and Surfaces A - Physicochemical and engineering aspects, 1994, **87**, (3), 217-234.
68. Manne, S., Cleveland, J. P., Gaub, H. E., Stucky, G. D., Hansma, P. K., *Direct visualization of surfactant hemimicelles by force microscopy of the electrical double layer*, Langmuir, 1994, **10**, 4409-4413.
69. Manne, S., Gaub, H. E., *Molecular organization of surfactants at solid-liquid interfaces*, Science, 1995, **270**, 1480-1482.

70. Senden, T. J., Drummond, C. J., Kekicheff, P., *Atomic force microscopy: imaging with electrical double layer interactions*, Langmuir, 1994, **10**, (2), 358-362.
71. Müller, D. J., Engel, A., *The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions*, Biophys. J., 1997, **73**, (9), 1633-1644.
72. Senden, T. J., Drummond, C. J., *Surface chemistry and tip-sample interactions in atomic force microscopy*, Colloids and Surfaces A - Physicochemical and engineering aspects, 1995, **94**, (1), 29-51.
73. Pohl, R. W., *Mechanik, Akustik und Wärmelehre*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1983.
74. Cleveland, J. P., Schaeffer, T. E., Hansma, P. K., *Probing oscillatory hydration potentials using thermal-mechanical noise in an atomic-force microscope*, Phys. Rev. B, 1995, **52**, (12), R8692-8695.
75. Radmacher, M., Fritz, M., Cleveland, J. P., Walters, D. R., Hansma, P. K., *Imaging adhesion forces and elasticity of lysozyme adsorbed on mica by atomic force microscopy*, Langmuir, 1994, **10**, 3809-3814.
76. Haydon, P. G., Lartius, R., Parpura, V., Marchese-Regona, S. P., *Membrane deformation of living cells using atomic force microscopy*, J. Microsc., 1996, **182**, (2), 114-120.
77. Coluccio, L. M., Tilney, L. G., *Phalloidin enhances actin assembly by preventing monomer dissociation*, J. Cell Biol., 1984, **99**, (2), 529-535.
78. Frimmer, M., *Mode of action of phalloidin*, Curr. Publ. Clin. Biochem., 1977, **7**, 29-36.
79. Satcher, R. L. J., Dewy, F. C. J., *Theoretical estimates of mechanical properties of the endothelial cell cytoskeleton*, Biophys. J., 1997, **71**, (7), 109-118.
80. Drake, B., Prater, C. B., Weisenhorn, A. L., Gould, S. A. C., Albrecht, T. R., Quate, C. F., Cannell, D. S., Hansma, H. G., Hansma, P. K., *Imaging crystals, polymers and biological processes in water with AFM*, Science, 1989, **243**, 1586-1589.
81. Müller, D. J., Schabert, F. A., Büldt, G., Engel, A., *Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy*, Biophys. J., 1995, **68**, 1681-1686.
82. Wisse, E., Braet, F., Luo, D., De Zanger, R., Jans, D., Crabbé, E., Vermoesen, A., *Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver*, Toxicol. Pathol., 1996, **24**, 100-111.
83. Braet, F., Zanger, R. D., Baekeland, M., Crabbé, E., Smissen, P. V. D., Wisse, E., *Structure and Dynamics of the Fenestrae-Associated Cytoskeleton of Rat Liver Sinusoidal Endothelial Cells*, Hepatology, 1995, **21**, (1), 180 - 189.
84. Braet, F., de Zanger, R., Kalle, W., Raap, A., Tanke, H., Wisse, E., *Comparative scanning, transmission and atomic force microscopy of the microtubular cytoskeleton in fenestrated liver endothelial cells*, Scanning Microsc., 1996, **10**, (Suppl.), 225-236.

85. Hopwood, D., *Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation*, Histochem. J., 1972, **4**, 267-303.
86. Johnson, T. J. A., *Glutaraldehyde fixation chemistry: oxygen-consuming reactions*, Eur. J. Cell. Biol., 1987, **45**, 160-169.
87. Arborgh, H., Bell, P., Brunk, U. T., Collins, V. P., *The osmotic effect of glutaraldehyde during fixation, a transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and cytochemical study*, J. Ultrastruct. Res., 1976, **56**, 339-350.
88. Laskin, D. L., *Role of hepatic macrophages in inflammation and tissue injury*, 1997, 161-176.
89. Marugg, R. A., Gehr, P., de Leeuw, M., *Secondary lysosomes as an integral part of the cytoskeleton: a morphological study in rat Kupffer cells*, J. of Struct. Biol., 1990, **105**, 146-153.
90. Smedsrød, B., De Bleser, P. J., Braet, F., Lovisetti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E., Geerts, A., *Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells*, 1994, **35**, 1509-1516.
91. Braet, F., De Zanger, R., Wisse, E., *Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells*, J. Microsc., 1997, **186**, 84-87.
92. Braet, F., Seynaeve, C., De Zanger, R., Wisse, E., *Imaging surface and submembrane structures with the atomic force microscope: a study on living cancer cells, fibroblasts and macrophages*, J. Microsc., 1998, **190**, (3), 328-338.
93. Radmacher, M., Cleveland, J. P., Hansma, P. K., *Improvement of thermally induced bending of cantilevers used for AFM*, Scanning, 1995, **17**, (2), 117-121.
94. Radmacher, M., Fritz, M., Hansma, P. K., *Imaging soft samples with the atomic force microscope: gelatin in water and propanol*, Biophys. J., 1995, **69**, (7), 264-270.
95. Domke, J., Rotsch, C., Hansma, P. K., Jacobson, K., Radmacher, M. in *ACS - Polymers in AFM*, ACS, Orlando, 1996, pp. 178-193.
96. Lee, J., Ishihara, A., Theriot, J. A., Jacobson, K., *Principles of locomotion for simple-shaped cells*, Nature, 1993, **362**, 167-171.
97. Inoué, S., *Cell division and the mitotic spindle*, J. Cell Biol., 1981, **91**, 131-147.
98. Brett, J. G., Godman, G. C., *Microvacuolation induced by cytochalasin: its relation to the cytoskeleton; morphological and cytochemical observations.*, Tissue Cell, 1984, **16**, (3), 311-324.
99. Godman, G., Woda, B., Kolberg, R., Berl, S., *Redistribution of contractile and cytoskeletal components induced by cytochalasin. I. In Hmf cells, a nontransformed fibroblastoid line*, Eur J Cell Biol, 1980, **22**, (2), 733-744.
100. Godman, G., Woda, B., Kolberg, R., Berl, S., *Redistribution of contractile and cytoskeletal components induced by cytochalasin. II. In HeLa and HEp2 cells*, Eur J Cell Biol, 1980, **22**, (2), 745-754.

101. Spector, I., Shochet, N. R., Kashman, Y., Groweiss, A., *Latrunculins: Novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells*, Science, 1983, **219**, 493-495.
102. Coue, M., Brenner, S. L., Spector, I., Korn, E. D., *Inhibition of actin polymerization by latrunculin A*, FEBS Lett, 1987, **213**, (2), 316-318.
103. Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D., Kashman, Y., *A structure - activity study of Latrunculin effects on microfilament organization [Abstract]*, J. Cell Biol., 1986, **103**, 393.
104. Lyubimova, A., Bershadsky, A. D., Ben-Ze'ev, A., *Autoregulation of actin synthesis responds to monomeric actin levels*, J Cell Biochem, 1997, **65**, (4), 469-478.
105. Oliveira, C. A., Chedraoui, S., Mantovani, B., *Latrunculin A is a potent inducer of aggregation of polymorphonuclear leukocytes*, Life Sci, 1997, **61**, (6), 603-609.
106. Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D., Kashman, Y., *Latrunculins: novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. comparison with cytochalasin D*, Cell Motil. Cytoskeleton, 1989, **13**, (3), 127-144.
107. Senderowicz, A. M., Kaur, G., Sainz, E., Laing, C., Inman, W. D., Rodriguez, J., Crews, P., Malspeis, L., Grever, M. R., Sausville, E. A., *Jasplakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells in vitro with disruption of the actin cytoskeleton*, J Natl Cancer Inst, 1995, **87**, (1), 46-51.
108. Duncan, M. D., Harmon, J. W., Duncan, L. K., *Actin disruption inhibits bombesin stimulation of focal adhesion kinase (pp125FAK) in prostate carcinoma*, J Surg Res, 1996, **63**, (1), 359-363.
109. Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L., Korn, E. D., *Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to f-actin*, J Biol Chem, 1994, **269**, (21), 14869-14871.
110. Sheikh, S., Gratzer, W. B., Pinder, J. C., Nash, G. B., *Actin polymerisation regulates integrin-mediated adhesion as well as rigidity of neutrophils*, Biochem Biophys Res Commun, 1997, **3**, (238), 910-915.
111. Braet, F., Spector, I., Zanger, R. d., Wisse, E., *A novel structure involved in the formation of liver endothelial cell fenestrae revealed by using the actin inhibitor misakinolide*, Proc. Natl. Acad. Scie., 1998, **95**, 13635-13640.
112. Salmon, E. D., McKeel, M., Hays, T., *Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicine*, J. Cell Biol., 1984, **99**, 1066-1075.
113. Manfredi, J. J., Parness, J., Horwitz, S. B., *Taxol binds to cellular microtubules*, J. Cell Biol., 1982, **94**, (3), 688-696.
114. Parness, J., Horwitz, S. B., *Taxol binds to polymerized tubulin in vitro*, J. Cell Biol., 1981, **91**, (2), 479-487.
115. Braet, F., De Zanger, R., Jans, D., Spector, I., Wisse, E., *Microfilament-Disrupting Agent Latrunculin A Induces an Increased Number of fenestrae in*

Rat Liver Sinusoidal Endothelial Cells: Comparison With Cytochalasin B, Hepatology, 1996, **24**, 627-635.

116. Sampath, P., Pollard, T., *Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments*, Biochem., 1991, **30**, 1973-1980.
117. Mitchison, T. J., Cramer, L. P., *Actin-based cell motility and cell locomotion*, Cell, 1996, **84**, 371-379.
118. Lauffenburger, D. A., Horwitz, A. F., *Cell migration: a physically integrated molecular process*, Cell, 1996, **84**, 359-369.
119. Elson, E. L., Felder, S. F., Jay, P. Y., Kolodney, M. S., Pasternak, C., in *Motion Analysis of Living Cells*; Ed.: 1997; pp. 67-83.
120. Oliver, T., Lee, J., Jacobson, K., *Forces exerted by locomoting cells*, Seminars in Cell Biology, 1994, **5**, 139-147.
121. Felder, S., Elson, E. L., *Mechanics of fibroblast locomotion: quantitative analysis of forces and motions at the leading lamellas of fibroblasts*, J. Cell Biol., 1990, **111**, (6(1)), 2513-2526.
122. Schmidt, C. E., Horwitz, A. F., Lauffenburger, D. A., Sheetz, M. P., *Integrin - cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric and regulated*, J. Cell Biol., 1993, **123**, 977-991.
123. Choquet, D., Felsenfeld, D. P., Sheetz, M. P., *Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages*, Cell, 1997, **88**, 39-48.
124. Wang, N., Butler, J. P., Ingber, D. E., *Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton*, Science, 1993, **260**, 1124-1127.
125. Dembo, M., Oliver, T., Ishihara, A., Jacobson, K., *Imaging the traction stress exerted by locomoting cells with the elastic substratum method*, Biophys. J., 1996, **70**, 2008-2022.
126. Oliver, T., Dembo, M., Jacobson, K., *Traction forces in locomoting cells*, Cell Mot. Cytoskeleton, 1995, **31**, 225-240.
127. Burton, K., Taylor, D. L., *Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata*, Nature, 1997, **385**, 450-454.
128. Galbraith, C. G., Sheetz, M. P., *A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1997, **94**, 9114-9118.
129. Pelham, R. J., Wang, Y. L., *Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1997, **94**, 13661-13665.
130. Theriot, J., Mitchison, T., *Comparison of actin and cell surface dynamics in motile fibroblasts*, J. Cell Biol., 1992, **118**, 367-377.
131. Abercrombie, M. J., Haeyman, J. E., Pegrum, S. M., *The locomotion of fibroblasts in culture. I. movements of the leading edge*, Exp. Cell Res., 1970, **59**, (393-398),
132. Small, J. V., *Microfilament-based motility in non-muscle cells*, Curr. Opin. Cell Biol., 1989, **1**, 75-79.
133. Condeelis, J., *Life at the leading edge: the formation of cell protrusions*, Annu. Rev. Cell Biol., 1993, **9**, 411-444.

134. Welch, M. D., Mallavarapu, A., Rosenblatt, J., Mitchison, T. J., *Actin dynamics in vivo*, Curr. Opin. Cell Biol., 1997, **9**, 54-61.
135. Keller, H. U., Bebie, H., *Protrusive activity quantitatively determines the rate and direction of cell movement*, Cell Motil. Cytoskeleton, 1996, **33**, 241-251.
136. Cunningham, C. C., *Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing*, J. Cell Biol., 1995, **129**, 1589-1599.
137. Fedier, A., Keller, H. U., *Suppression of bleb formation, locomotion and polarity of Walker carcinosarcoma cells by hypertonic media correlates with cell volume reduction but not with changes in the f-actin content*, Cell Motil. Cytoskeleton, 1997, **33**, 326-337.
138. Oster, G., Perelson, A., *The physics of cell motility*, J. Cell Sci. Suppl.: Cell Behavior; Shape, Adhesion, Motility, 1988,
139. Peskin, C. S., Odell, G. M., Oster, G. M., *Cellular motions and thermal fluctuations: the brownian ratchet*, Biophys. J., 1993, **65**, 316-324.
140. Olbris, D. J., Herzfeld, J., in *Statistical Mechanics in Physics and Biology*; Ed.: D. Wirtz and T. C. Halsey, Pittsburgh, PA, USA, 1996; pp.
141. Mogilner, A., Oster, G., *Cell motility driven by actin polymerization*, Biophysical Journal, 1996, **71**, 3030-3045.
142. Strohmeier, R., Bereiter-Hahn, J., *Hydrostatic pressure in epidermal cells is dependent on Ca-mediated contractions*, J. Cell Sci., 1987, **88**, 631-640.
143. Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B., Borisy, G. G., *Improved procedures for electron microscopic visualization of the cytoskeleton of cultured cells*, J. Struct. Biol., 1995, **115**, 290-303.
144. Small, J. V., *Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks*, J. Cell Biol., 1981, **91**, 695-705.
145. Bray, D., White, J. G., *Cortical flow in animal cells*, Science, 1988, (2), 883-887.
146. Kolega, J., *Effects of mechanical tension on protrusive activity and microfilament and intermediate filament organization in an epidermal epithelium moving in culture*, J. Cell Biol., 1986, **102**, 1400-1411.
147. Goodrich, H. B., *Cell behaviour in tissue cultures*, Biol. Bull (Woods Hole), 1924, **46**, 252-262.
148. Cooper, M. S., Schliwa, M., *Motility of cultured fish epidermal cells in the presence and absence of direct current electric fields*, J. Cell Biol., 1986, **102**, 1384-1399.
149. Nabi, I. R., Watanabe, H., Raz, A., *Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and metastasis*, Cancer Metastasis Rev., 1992, **11**, 5-20.
150. Yeatman, T. J., Nicholson, G. L., *Molecular basis of tumor progression: mechanisms of organ-specific tumor metastasis*, Seminars Surg. Oncol., 1993, **9**, 256-263.
151. Aznavoorian, S., Murphy, A. N., Stetler-Stevenson, W. G., *Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis*, Cancer, 1993, **71**, 1368-1383.

152. Pedersen, P. H., Ness, G. O., Engebraaten, O., *Heterogeneous response to the growth factors [EGF, PDGF (bb), TGF-alpha, bFGF, IL-2] on glioma spheroid growth, migration and invasion*, Int. J. Cancer, 1994, **56**, 255-261.
153. Hoelting, T., Siperstein, A. E., Clark, O. H., *Epidermal growth factor enhances proliferation, migration, and invasion of follicular and papillary thyroid cancer in vitro and in vivo*, J. Clin. Endocr. Metab., 1994, **79**, 401-408.
154. Hall, A. L., Warren, V., Dharmawardhane, S., Condeelis, J., *Identification of actin nucleation activity and polymerization inhibitor in amoeboid cells: their regulation chemotactic stimulation*, J. Cell Biol., 1989, **118**, 1421-1442.
155. Carson, M., Weber, A., Zigmond, S., *An actin-nucleating activity in polymorphonuclear leukocyte lysates is modulated by chemotactic peptides.*, J. Cell Biol., 1986, **103**, 2707-2714.
156. Hartwig, J. H., *Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation*, J. Cell Biol., 1992, **118**, (6), 1421-1442.
157. Neri, A., Welch, D., Kawaguchi, D., Nicholson, G. L., *Development and biological properties of malignant cell sublines and clones of a spontaneously metastasizing rat mammary adenocarcinoma*, J. Nat. Cancer Inst., 1982, **68**, 507-517.
158. Segall, J., Tyerach, S., Boselli, L., Masseling, S., Helft, J., Chan, A. Y., Jones, J., Condeelis, J. S., *EGF stimulates lamellipod extension in metastatic mammary adenocarcinoma cells by an actin-dependent mechanism*, Clin. Exp. Metastasis, 1996, **14**, 61-72.
159. Chan, A. Y., Raft, S., Bailly, M., Wyckroff, J. B., Segall, J. E., Condeelis, J. S., *EGF stimulates an increase in actin nucleation and filament number at the leading edge of the lamellipod in mammary adenocarcinoma cells*, J. Cell Sci., 1998, **111**, 199-211.
160. Zigmond, S. H., *Signal transduction and actin filament organization*, Curr. Opin. Cell Biol., 1996, **8**, 66-73.
161. Becker, M., Kerstiens, B., Schönherr, J., *Water permeability of plant cuticles: permeance, diffusion and partition coefficients*, Trees, 1986, **1**, (54-60),
162. Sitte, P., Rennier, R., *Untersuchungen an cuticularen Zellwandschichten*, Planta, 1993, **60**, 19-40.
163. Lenzian, K., in *Reviews of environmental contamination and toxicology*, Ed.: G. W. Ware, New York, 1991; pp.
164. Baker, E. A., in *The plant cuticle*; Ed.: D. F. Cutler, K. L. Alvin and C. E. Price, London, 1982; pp. 139-165.
165. Schönherr, J., *Water permeability of isolated cuticula membranes: the effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores in the cutin matrix*, Planta, 1976, **131**, 159-164.
166. Domke, J., Parak, W. J., George, M., Gaub, H. E., Radmacher, M., *Mapping the mechanical pulse of single cardiomyocytes with the atomic force microscope*, Eur. Biophys. J., 1998, **28**, (3), 179-186.

167. Clay, J. R., Brochu, R. M., Shrier, A., *Phase resetting of embryonic chick atrial heart cell aggregates. Experiment and Theory, Biophys. J.*, 1990, **58**, 609-621.
168. Smedsrød, B., Pertoft, H., Eggertsen, G., Sundström, C., *Functional and morphological characterization of cultures of Kupffer cells and liver endothelial cells prepared by means of density separation in Percoll and selective substrate adherence, Cell Tissue Res.*, 1985, **241**, 639-649.
169. Braet, F., De Zanger, R., Sasaoki, T., Baekeland, M., Janssens, P., Smedsrød, B., Wisse, E., *Assessment of a method of isolation, purification and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells, Lab. Invest.*, 1994, **70**, 944-952.
170. Orgell, W. H., *The isolation of plant cuticle with pectic enzymes, Plant Physiol.*, 1955, **30**, 70-78.

Eigene Veröffentlichungen

1. Rotsch, Chr., Radmacher, M., *Measuring electrostatic interactions with the atomic force microscope*, Langmuir, 1997, **13** (10), 2825-2832.
2. Hofmann, U. G., Rotsch, Chr., Parak, W. J., Radmacher, M., *Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope*, J. Struct. Biol., 1997, **119**, 84-91.
3. Rotsch, Chr., Jacobson, K., Radmacher, M., *Investigating living cells with the atomic force microscope*, *Scanning Microscopy*, 1997, im Druck.
4. Domke, J., Rotsch, Chr., Hansma, P. K., Jacobson, K., Radmacher, M., *Atomic force microscopy of soft samples: gelatin and living cells*, in ACS Symposium Series - Scanning Probe Microscopy of Polymers; ACS, Orlando, 1996, 178-193
5. Braet, F., Rotsch, Chr., Wisse, E., Radmacher, M., *Comparison of fixed and living endothelial cells by atomic force microscopy*, Appl. Phys. A, 1997, **66**, S575-S578.
6. Rotsch, Chr., Braet, F., Wisse, E., Radmacher, M., *AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages*, Cell Biol. Int., 1997, **21** (11), 685-696.
7. Rotsch, Chr., Jacobson, K., Radmacher, M., *The dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by atomic force microscopy*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1999, **96** (3), 921-926.
8. Rotsch, Chr., Radmacher, M., *Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts - an atomic force microscopy study*, Biophys. J., 1999, eingereicht.
9. Kacher, C. M., Rotsch, Chr., Lenzian, K., Radmacher, M., Fritz, M., *Elasticity measurements on isolated plant cuticles in air and in water done with the atomic force microscope*, 1999, in Vorbereitung.
10. Rotsch, Chr., Jacobson, K., Radmacher, M., *EGF-stimulated lamellipod extension in mammary adenocarcinoma cells investigated by atomic force microscopy*, 1999, in Vorbereitung.

Lebenslauf

Christian Rotsch

geboren am 18. Februar 1971 in Mühlhausen (Thüringen)

Schule

1977-1987 Polytechnische Oberschule „Karl-Liebknecht“ Bad Langensalza

1987-1989 Spezialklasse für Mathematik und Physik der Martin-Luther-Universität Halle

Studium

WS89-SS95 Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Diplomarbeit: „Fehlererkennung an Röntgentransmissionsgittern unter Ausnutzung ihrer Polarisationsseigenschaften im Infrarotbereich“
am Max-Planck-Institut für Extraterrestrische Physik

seit Nov.95 Promotion am Lehrstuhl für angewandte Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Thema: „Elastizitätsmessungen an lebenden Zellen mit dem Rasterkraftmikroskop“

